

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CLAUDIA PUDELL

**ÓLEO DE PEIXE PROMOVE BENEFÍCIOS NA ANSIEDADE, MEMÓRIA E TEM
EFEITOS ANTIDEPRESSIVOS EM RATOS SUBMETIDOS À BULBECTOMIA
OLFATÓRIA**

CURITIBA 2012

CLAUDIA PUDELL

**ÓLEO DE PEIXE PROMOVE BENEFÍCIOS NA ANSIEDADE, MEMÓRIA E TEM
EFEITOS ANTIDEPRESSIVOS EM RATOS SUBMETIDOS À BULBECTOMIA
OLFATÓRIA**

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de mestre em Fisiologia, curso de
Pós-graduação em Fisiologia, Setor de Ciências
Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientação: Profa. Dra. Anete Curte Ferraz

CURITIBA 2012



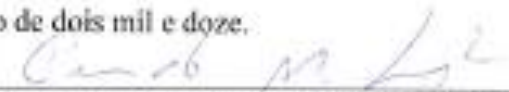
Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Departamento de Fisiologia
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia




Ata da defesa de dissertação de mestrado de CLAUDIA PUDELL

Aos vinte e nove dias do mês de agosto do ano de dois mil e doze, foi realizada no Auditório do departamento de Fisiologia do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, a defesa de dissertação da mestranda **CLAUDIA PUDELL**, intitulada **"ÓLEO DE PEIXE PROMOVE BENEFÍCIOS NA ANSIEDADE, MEMÓRIA E TEM EFEITOS ANTIDEPRESSIVOS EM RATOS SUBMETIDOS À BULBECTOMIA OLFATÓRIA"**. A abertura teve início às 08h30min pela Presidente da Banca Examinadora e Orientadora da candidata, Professora Doutora Anete Curte Ferraz. A Presidente apresentou ao público presente os membros da banca examinadora e logo passou a palavra à aluna, para que fizesse uma apresentação sucinta de sua dissertação. Após a explanação oral, a Professora Doutora Anete Curte Ferraz passou a palavra ao primeiro examinador, Professor Doutor Fernando Mazzilli Louzada do Departamento de Fisiologia da UFPR. Na sequência, passou a palavra ao segundo examinador, Professora Doutora Roseli Boerngen de Lacerda do Departamento de Farmacologia da UFPR. A aluna respondeu as perguntas dos examinadores e se posicionou frente às críticas. Findas as arguições pelos demais membros da banca, a Presidente, Professora Doutora Anete Curte Ferraz fez uma rápida apreciação das conclusões mais importantes dos debates realizados e comunicou que a Banca Examinadora iria reunir-se em sessão secreta para discussão e atribuição dos conceitos. Os trabalhos foram interrompidos por cinco minutos. Após haver analisado o referido trabalho e arguido a candidata, os membros da banca examinadora reunidos em sessão secreta deliberaram pela "aprovação", habilitando-a ao título de Mestre em Fisiologia, condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Art. 59º do Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação. Eu, Anete Curte Ferraz, Presidente da Banca Examinadora lavrei a presente ata, da qual assino juntamente com os senhores examinadores.

Curitiba, 29 de agosto de dois mil e doze.


Professor Doutor Fernando Mazzilli Louzada
UFPR- Membro Titular


Professora Doutora Roseli Boerngen de Lacerda
UFPR - Membro Titular


Professora Doutora Anete Curte Ferraz
UFPR - Orientadora e Presidente da Banca Examinadora

AGRADECIMENTOS

Enfim, chegou a hora. Hora de fazer os agradecimentos. E com certeza não são poucos. Há aqueles que estiveram comigo sempre, outros em apenas alguns momentos, e também aqueles que talvez nem saibam o quão importantes. Mas, a cada um deles, o meu mais gigante obrigado. Por mais clichê que seja não poderei evitar... “Se não fosse por vocês, eu não estaria aqui...”

Mas, é claro, vamos começar a nominar os personagens dessa estória.

À Deus, que me iluminou e me deu forças para concluir essa jornada.

À minha mãe, que SEMPRE fez o possível e impossível para que eu chegasse até aqui. Com certeza a pessoa mais importante da minha vida, e espero que sempre saiba o quão imensamente agradecida sou por cada gesto seu.

À professora Dra. Anete Curte Ferraz, que, apesar da minha chegada de pára-quedas, me acolheu e me abriu as portas do laboratório, ajudando a percorrer esse longo caminho. Foram muitas dificuldades, mas muito maiores foram as recompensas. Foi um prazer fazer parte da equipe e ser orientada por você, Anete. Obrigada!

Aos colegas do Laboratório de Neurofisiologia, o melhor laboratório do mundo inteiro. Podemos não ter a tecnologia que sonhamos, mas temos as melhores pessoas com as quais poderíamos trabalhar. Começou como um lugar onde pessoas trabalham com objetivos comuns, mas se tornou muito mais que isso: uma família. E foi com esse apoio que contei quando nos momentos de maior dificuldade, quando quis jogar tudo pro alto e não me deixaram. Temos gente séria e casada, e também gente que só quer saber de ir pra academia e nos fazer rir. Gente que introduz frases clássicas no laboratório, que certamente serão jargões eternos. Tem gente que, comigo, quase surtou com SmartJunior e Barnes, quase dormiu em cima do videocassete às 7:30h da manhã de domingo, fez café e mais café, e me ajudou a passar de porta em porta com a térmica, copinhos e açúcar. Resultaram episódios clássicos: roubo de presentes do inimigo secreto; Jumper; Diabo Verde; boiler: a novela; Beto Barbosa e seus clássicos; o melhor anestésico do mundo; entre outros. Histórias não vão faltar, pra lembrar e contar a vida toda. Obrigada por tudo isso.

Deixando um pouco a irreverência de lado... Muitíssimo obrigada à Bianca Arão Vicente, minha fiel escudeira. Espero que sua iniciação científica tenha sido o mais proveitosa possível. Igualmente ao Bruno Carabelli, Marco Aurélio Mori, Ana Márcia Delattre, Adriano Targa Dias Santos, Laís Soares Rodrigues: foi difícil, mas chegamos ao final. Obrigada do fundo do coração. Também à Aparecida Vines, Fabíola Vila dos Santos, Maíra Maturana, Mariana Fortes e Mariana Proença, o pessoal da iniciação científica, em especial à Paula Kempe. Foram companheiros de tantas suplementações, trocas de caixas, cirurgias, testes comportamentais, retirada de estruturas, preparo de soluções, análise de dados, estatísticas e até faxinas. Foi um prazer trabalhar com vocês.

À Glaucia Tobaldini e Andressa Perin Martins, colegas de profissão, de mestrado e de casa, que além da ajuda experimental, foram essenciais no decorrer de todo esse tempo. Por todo suporte, toda paciência, companheirismo e pelas horas de chimarrão. Também às colegas de mestrado Priscilla, Fabíola Juliane, Adriana, Dabna: muitas horas e muitas lembranças boas. Ainda, aos demais colegas de mestrado, com os quais passei horas em sala de aula, em laboratório, na sala de convivência, ou ainda no RU.

Ao meu noivo, Dirleo Sanches Kuhnen, que esteve ao meu lado nos momentos mais cruciais da finalização do mestrado. Deu todo suporte, carinho, compreensão e teve toda paciência do mundo quando precisei. Te amo! Muito obrigada por tudo...

Ao professor Dr. Marcelo de Meira Santos Lima, pelo auxílio no início dos procedimentos experimentais cirúrgicos e também do manuscrito.

À doutoranda Jeyce Willig Quintino dos Santos, da Universidade Federal do Espírito Santo, pelas dicas fundamentais em relação ao procedimento da bulbectomia.

Ao professor Dr. Silvio M. Zanata, do departamento de Patologia da UFPR, pela ajuda nas análises de BDNF.

À professora Dra. Deborah Sucheki e ao Dr. Ricardo Borges Machado, do departamento de psicobiologia da Unifesp, pela dosagem de monoaminas e auxílio no manuscrito.

Ao prof. Dr. Jesuí Vergílio Visentainer e doutorandos Oscar de Oliveira Santos Junior, Paula Fernandes Montanher e Elton G. Bonafé, do Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá, pelas análises lipídicas.

Aos professores do setor de Fisiologia da UFPR, que contribuíram grandemente com minha formação. Foram exemplos em diversos sentidos.

À Fundação Herbarium de Pesquisa e Saúde, que gentilmente cedeu as cápsulas de óleo de peixe utilizadas na suplementação dos animais.

A todas as pessoas que, desde a origem da idéia até sua conclusão, direta ou indiretamente, contribuíram para que eu chegasse ao final dessa jornada. Os ganhos extrapolam a simples conclusão do mestrado, com desafios superados e objetivos alcançados. Foi um aprendizado de vida.

“Para ganhar conhecimento, adicione coisas todos os dias.

Para ganhar sabedoria, elimine coisas todos os dias.”

Lao-Tsé

RESUMO

A depressão é um transtorno cada vez mais presente na população, e sua fisiopatologia e tratamento vêm sendo estudados através de diversos modelos animais, um deles a bulbectomia olfatória. Recentemente foi observado que a suplementação com óleo de peixe, rico em ω -3, durante as fases pré e pós-natais foi capaz de diminuir comportamentos depressivos e ansiosos. O presente estudo foi dedicado a avaliar o envolvimento da suplementação com óleo de peixe (OP) sobre o comportamento depressivo e déficit cognitivo induzido pelo modelo da bulbectomia. Em nosso estudo, foram utilizadas ratas matrizes, as quais foram suplementadas durante os períodos de adaptação, acasalamento, gestação e lactação e, seus filhotes foram, na vida adulta, submetidos à bulbectomia olfatória. Após 14 dias de recuperação pós-cirúrgica os animais de 94 dias foram submetidos aos testes comportamentais. Os conteúdos hipocampus de BDNF, da 5-HT e DA e de seus metabólitos, 5-HIAA (ácido 5-hidroxi-indolacético) e DOPAC (ácido 3,4-dihidroxifenilacético), respectivamente, foram determinados nos animais experimentais de 102 dias de idade. Os animais bulbectomizados apresentaram comportamento ansioso quando expostos ao Labirinto em Cruz Elevado, assim como comportamento depressivo ao passarem pelo teste de Natação Forçada Modificado, comportamento que foi revertido pela suplementação com óleo de peixe. Em relação à memória, foi observado que o óleo de peixe foi eficaz em atenuar os déficits causados pela bulbectomia no teste de Localização de Objetos, que avalia memória dependente de hipocampo. Nos animais bulbectomizados foi detectado decréscimo na expressão de BDNF e 5-HT hipocampus. Nos animais suplementados foi detectado acréscimo na expressão de BDNF no hipocampo. No grupo OP houve acréscimo nos níveis da 5-HT, embora a formação de 5-HIAA estivesse diminuída no hipocampo, indicando baixa metabolização da 5-HT nessa região cerebral. O óleo de peixe foi capaz de prevenir os déficits neuroquímicos observados nos animais bulbectomizados. De acordo com nossos resultados, a suplementação durante as fases pré-concepção à lactação, ou seja, nos períodos mais críticos de desenvolvimento dos neurônios cerebrais, foi capaz de atenuar o aparecimento de sintomas depressivos, assim como disfunções cognitivas, em ratos submetidos à bulbectomia. Assim, sugere-se que a suplementação promoveu aumento na expressão de BDNF e na transmissão serotoninérgica do hipocampo. Esses resultados do óleo de peixe culminaram em um robusto efeito antidepressivo. Considerando o papel inquestionável do BDNF na promoção da sobrevivência neuronal, o presente estudo demonstrou que o aumento da expressão de BDNF no hipocampo neutralizou os déficits na memória espacial induzidos pela OBX. Esses dados confirmam os efeitos antidepressivos da suplementação com ácidos graxos ω -3, os quais estão relacionados com aumento na transmissão serotoninérgica do hipocampo. O óleo de peixe parece mediar um envolvimento recíproco de ativação do sistema serotoninérgico com aumento na expressão de BDNF no hipocampo, e o aumento desta neurotrofina parece combater os déficits de memória induzidos pela bulbectomia olfatória.

Palavras-chave: Depressão; Óleo de peixe; Bulbectomia olfatória; Memória; BDNF; Serotonina;

ABSTRACT

Depression is a disorder that is increasingly present in the population, and its pathophysiology and treatment have been studied using several animal models, including olfactory bulbectomy (OBX). It was recently observed that fish oil supplementation rich in ω -3, during pre-and postnatal periods was able to decrease depression and anxiety behaviors. The present study was devoted to evaluate the involvement of fish oil supplementation on the depressive behavior and cognitive impairment induced by the olfactory bulbectomy model of depression. In our study, were used female rats as matrices, which were supplemented during periods of adjustment, mating, gestation and lactation and their pups were, in adulthood, underwent to olfactory bulbectomy. After 14 days of postoperative recovery, the 94 days old animals were subjected to behavioral tests. The content of hippocampal BDNF, 5-HT and DA and their metabolites, 5-HIAA (5-hydroxy-indoleacetic) and DOPAC (3,4-di-hydroxyphenylacetic), respectively, were determined when the experimental animals had 102 days of age. The bulbectomized animals exhibited anxious behavior when exposed to elevated plus maze, as well as depressive behavior when they were submitted to the Modified Forced Swimming Test, behaviors that were reversed by fish oil supplementation. Regarding memory, it was observed that fish oil was effective in attenuating deficits caused by OBX in the Object Location Task, which assesses hippocampus-dependent memory. In bulbectomized animals, was detected decrease in the expression of hippocampal BDNF and 5-HT. In the supplemented animals was detected increased expression of BDNF in the hippocampus. In the FO group, there was increase in the levels of 5-HT, although the formation of 5-HIAA were reduced in the hippocampus, indicating low 5-HT metabolism in this brain region. The fish oil was able to reverse the neurochemical deficits observed in bulbectomized animals. According to our results, supplementation during the pre-conception to lactation, ie, the most critical periods of development of brain neurons, was able to attenuate the onset of depressive symptoms, and cognitive dysfunction in rats submitted to bulbectomy. Therefore, we suggest that supplementation increased the BDNF expression and serotonergic transmission in the hippocampus. The results of fish oil culminated in a robust antidepressant effect. Considering the unquestionable role of BDNF in promoting neuronal survival, this study demonstrated that increased expression of BDNF in the hippocampus counteracted the deficit in spatial memory induced by OBX. These data confirm the antidepressant effects of supplementation with ω -3 fatty acids, which are associated with increased serotonergic transmission in the hippocampus. Fish oil appears to mediate a reciprocal involvement of the serotonergic system activation with increased expression of BDNF in the hippocampus, and the increase of this neurotrophin seems to counter the memory deficits induced by olfactory bulbectomy.

Keywords: Depression, Fish Oil, Olfactory Bulbectomy; Memory; BDNF, serotonin;

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ESTRUTURA QUÍMICA DOS PRECURSORES DOS ÁCIDOS GRAXOS DAS FAMÍLIAS ω -6 E ω -3, RESPECTIVAMENTE.	16
FIGURA 2 - ETAPAS BIOQUÍMICAS PARA SÍNTESE DOS ÁCIDOS GRAXOS.	17
FIGURA 3 - BULBO OLFATÓRIO E SUAS CONEXÕES.....	23
FIGURE 1 - TIME LINE SHOWING EXPERIMENTAL DESIGN.....	31
FIGURE 2 – RESULTS OF OPEN FIELD TEST.....	37
FIGURE 3 - RESULTS OF MODIFIED FORCED SWIM TEST.....	38
FIGURE 4 - RESULTS OF ELEVATED PLUS MAZE TEST.....	39
FIGURE 5 - OBJECT LOCATION TEST.	40
FIGURE 6 - BDNF QUANTIFICATION. MEASUREMENT OF BDNF CONCENTRATION (NG/MG) IN THE HIPPOCAMPUS.	41
FIGURE 7 - HIPPOCAMPAL NEUROCHEMICAL DATA.	42

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HIAA (5-hydroxyindolacetic): Ácido 5-Hidroxi-indolacético.

5-HT (Serotonine): serotonina.

6-OHDA: 6-hidroxidopamina.

AA (Aracdonic acid): Ácido aracdônico.

AGPI's: Ácidos graxos poli-insaturados.

ANOVA: Analysis of variance.

BDNF (Brain derived neurotrofic factor): Fator neurotrófico derivado do encéfalo.

cPLA2: Cytosolic phospholipase A2.

DA (Dopamine): dopamina.

DHA (Docosahexaenoic acid): Ácido docosahexaenoico.

DOPAC: 3,4-dihydroxyphenylacetic.

DSM-IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders): Manual diagnóstico e estatístico de doenças mentais, revisão IV.

EPA (Eicosapentaenoic acid): Ácido eicosapentaenoico.

EPM: Elevated plus maze.

FO: Fish oil.

HPLC: High-performance liquide chromatography.

IL-1 β : Interleukin - 1beta.

IL-6: Interleucina 6.

IMAOs: Inibidores da enzima monoaminooxidase.

MFST: Modified forced swim test.

NGF: Nerve grow factor.

OBX (Olfactory bulbectomy): Bulbectomia olfatória.

OF: Open field.

OLT: Object Location Task.

PCPA: Paraclorofenilalanina.

PGE2: Prostaglandin E2.

PUFA: Polyunsaturated fatty acids.

TNF- α : Fator de necrose tumoral – alfa.

ω -3: Ômega-3.

ω -6: Ômega-6.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 DEPRESSÃO	13
1.1.1 TEORIAS DA ETIOLOGIA DA DEPRESSÃO	13
1.1.2 ÁCIDOS GRAXOS	15
1.1.3 ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS (AGPI'S).....	16
1.1.4 ÁCIDOS GRAXOS ω -3 X GESTAÇÃO E LACTAÇÃO	18
1.1.5 ÁCIDOS GRAXOS ω -3 X DEPRESSÃO	20
1.1.6 MODELOS ANIMAIS DE ESTUDO.....	22
1.1.7 BULBECTOMIA OLFATÓRIA	22
2 JUSTIFICATIVA.....	25
3 OBJETIVOS	26
3.1 OBJETIVO GERAL.....	26
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
4 MANUSCRITO	27
1. INTRODUCTION	28
2. METHODS.....	29
3. RESULTS	36
4. DISCUSSION	44
5. CONCLUSION.....	48
5 DISCUSSÃO	49
6 CONCLUSÃO.....	56
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

1 INTRODUÇÃO

1.1 DEPRESSÃO

A depressão é um transtorno de humor que, segundo a Organização Mundial de Saúde será a principal causa de incapacidade em todo o mundo, ficando atrás apenas das doenças cardiovasculares, sendo assim de fundamental importância o conhecimento de sua etiologia, assim como criação de estratégias eficazes de tratamento. Segundo o DSM-IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders), são critérios para diagnóstico de depressão: estado deprimido, anedonia, sensação de culpa, dificuldade de concentração, fadiga, insônia ou hipersonia, agitação ou retardo psicomotor, perda ou ganho de peso, idéias de morte ou suicídio. Pode ser classificada, de acordo com o número de itens positivos, em: a) depressão menor: 2 a 4 sintomas por duas ou mais semanas, incluindo estado deprimido ou anedonia; b) distímia: 3 ou 4 sintomas, incluindo estado deprimido, durante dois anos, no mínimo; e c) depressão maior: 5 ou mais sintomas por duas semanas ou mais, incluindo estado deprimido ou anedonia (DSM-IV-TR/2000).

Embora hajam muitas hipóteses isoladas explicando sua etiologia, a depressão é uma doença multifatorial. Estudos epidemiológicos demonstram que até 50% do risco de desenvolver depressão tem causa genética (NESTLER, 2002). Ainda, fatores ambientais são bastante importantes, sendo o aumento da responsividade ao estresse externo e respostas inadequadas à eventos de vida negativos (KUBERA *et al.*, 2010), assim como mudanças nos hábitos alimentares (SIMOPOULOS, 2002), muito associados às fases iniciais da patologia.

1.1.1 Teorias da Etiologia da depressão

A depressão apresenta uma etiologia complexa, sendo aceita predominantemente a teoria monoaminérgica, segundo a qual a depressão é consequência de um defeito em um dos sistemas modulatórios difusos (Serotoninérgico ou Noradrenérgico) levando a um desequilíbrio de

neurotransmissores “monoaminérgicos” serotonina e/ou noradrenalina liberados no encéfalo (DUMAN; HENINGER; NESTLER, 1997; NESTLER, 2002).

A hipótese das monoaminas cresceu originalmente de associações entre os efeitos clínicos de vários fármacos que causam ou amenizam os sintomas da depressão e seus efeitos neuroquímicos conhecidos sobre a transmissão monoaminérgica no cérebro (DUMAN; HENINGER; NESTLER, 1997).

A associação do distúrbio à deficiência das aminas biogênicas é fundamentada em resultados de exames bioquímicos que detectaram baixos níveis de noradrenalina e serotonina no sangue, urina e líquido de pacientes com depressão (HENINGER *et al.*, 1996; DUMAN HENINGER; NESTLER, 1997). Outro fator que corrobora essa teoria é o tratamento, muitas vezes eficaz, com inibidores da enzima monoaminooxidase (IMAOs) e com drogas que inibem a recaptação desses neurotransmissores, como os Antidepressivos Tricíclicos e os Inibidores Seletivos da Recaptação da Serotonina e/ou Noradrenalina. Outro aspecto importante é a associação de baixos níveis do ácido 5-Hidroxiindolacético (5-HIAA), metabólito da serotonina, à tendência ao suicídio na depressão (CARLSON, 2002).

Ainda, há a hipótese das neurotrofinas, segundo a qual a diminuição do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) tem papel fundamental na patogênese da depressão (LUO *et al.*, 2010). Foi observado que na depressão ocorre deficiência de BDNF, levando consequentemente à diminuição do volume hipocampal (VAIDYA; DUMAN, 2001; SONG; WUANG, 2011). Esse fato demonstrou a importância do BDNF na função neuronal, uma vez que é uma das principais neurotrofinas responsáveis pela modulação da plasticidade no hipocampo (PANG *et al.*, 2004a; PANG *et al.*, 2004b; TYLER *et al.*, 2002). De fato, tratamentos com antidepressivos demonstraram normalização dos níveis de BDNF no sangue, antes diminuídos nesses pacientes deprimidos (BOLDRINI *et al.*, 2009; KAREGE *et al.*, 2005).

Por outro lado, existem vários estudos apontando para a inflamação como fator causal da depressão (SU *et al.*, 2010; MCNAMARA *et al.*, 2010; SONG; WANG, 2010; MAES, 2010; LOFTIS; HUCKANS; MORASCO, 2010). Uma meta-análise acerca das citocinas pró-inflamatórias na depressão maior relata maiores concentrações de TNF- α (fator de necrose tumoral alfa) e IL-6 (interleucina 6) em indivíduos deprimidos, comparados a indivíduos não deprimidos (DOWLATI *et al.*, 2010).

Ainda, deficiências na transdução dos sinais que regulam a neuroplasticidade e sobrevivência celulares vêm sendo considerados importantes mecanismos que contribuem para o processo patológico em questão (ZHANG *et al.*, 2002).

Por ser uma patologia de grande incidência, portanto de grande interesse médico, potenciais tratamentos são amplamente estudados, no sentido de melhorar as atuais alternativas e/ou criar novas.

Baseados na teoria monoaminérgica, a maioria dos medicamentos aumentam a neurotransmissão das monoaminas, através de diferentes mecanismos (KISS, 2008). Clinicamente, os inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ISRS) e os recaptadores de noradrenalina têm uma eficácia semelhante, embora a individualidade contribua na resposta. Os efeitos bioquímicos diretos dos antidepressivos aparecem mais rapidamente, enquanto os efeitos terapêuticos levam semanas para se desenvolver, sugerindo que alterações secundárias adaptativas do cérebro, e não o efeito primário do fármaco, sejam responsáveis pela melhora clínica (RANG; DALE, 2007).

Nesse contexto, um número cada vez maior de possíveis agentes antidepressivos é vislumbrado, não necessariamente medicamentos tradicionais. É o caso do óleo de peixe, mais especificamente, o ômega-3 (ω -3). É sabido que o encéfalo possui altas concentrações de lipídeos complexos, os quais determinam propriedades estruturais e funcionais das membranas das células e das organelas (FAROOQUI *et al.*, 2000; FEDOROVA; SALEM JR, 2006). Lipídeos específicos (que serão detalhados adiante) têm um papel importante no metabolismo encefálico, influenciando o desempenho cognitivo, a acuidade visual, metabolismo de neurotransmissores e desenvolvimento neural (CHALON *et al.*, 2001), sendo que sua deficiência pode causar perda de habilidades de aprendizagem, memória ou culminar em doenças neurológicas na vida adulta (YOU DIM *et al.*, 2000; FEDOROVA; SALEM JR, 2006).

1.1.2 Ácidos graxos

Os ácidos graxos e os seus derivados, como os triacilgliceróis e fosfolipídeos, são exemplos de lipídios. Eles compõem um conjunto de moléculas

biológicas que têm a característica comum de serem insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos, com funções de reserva energética, composição das membranas celulares e um importante papel na sinalização celular e precursor de moléculas bioativas (prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos) (RIEMER *et al.*, 2010; ALBERTS *et al.*, 2004; COOPER; HAUSMAN, 2007). Uma molécula de ácido graxo tem duas regiões quimicamente distintas: uma delas formada por uma longa cadeia hidrocarbonada, que é hidrofóbica e não tem muita reatividade química; a outra é um grupo carboxila que se comporta como um ácido, se ionizando em solução, extremamente hidrofílico e reativo quimicamente (ALBERTS *et al.*, 2004).

De acordo com as ligações moleculares presentes, os ácidos graxos podem ser classificados em saturados, com ausência de dupla ligação; monoinsaturados, com apenas uma dupla ligação; ou poli-insaturados, apresentando mais de uma dupla ligação (BOTHAM; MAYES, 2007). Os ácidos graxos insaturados têm pontos de fusão mais baixo do que os ácidos graxos saturados de mesmo comprimento, o que aumenta sua fluidez, assim como de seus derivados (VOET; VOET, 2006).

1.1.3 Ácidos graxos poli-insaturados (AGPI's)

Os ácidos graxos α -linolênico e linoléico) são essenciais para funções celulares normais, e são precursores para a síntese de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa ω -3 e ω -6, respectivamente (BOTHAM; MAYES, 2007), como visto na figura 1.

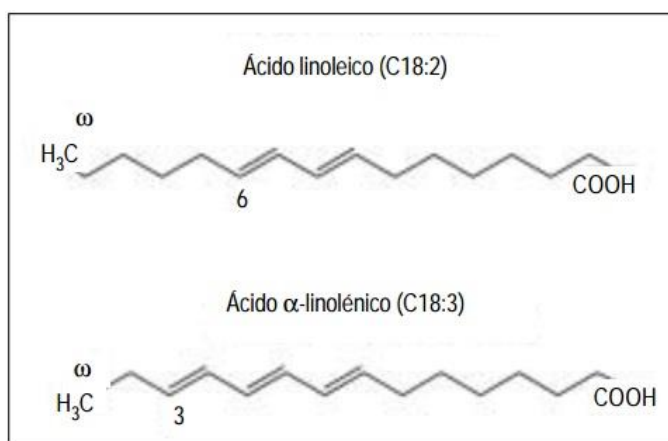


Figura 1 – Estrutura química dos precursores dos ácidos graxos das famílias ω -6 e ω -3, respectivamente.

Fonte: Rodríguez-Cruz *et al.*, 2005.

Embora os mamíferos sejam capazes de produzir ácidos graxos moniinsaturados, eles não possuem as enzimas Δ^{12} dessaturase e Δ^{15} dessaturase, não sendo capazes de sintetizar os ácidos graxos ω -3 e ω -6, que, portanto, devem ser obtidos através da alimentação (BOTHAM; MAYES, 2007; CALDER, 2003). São encontrados ω -3 principalmente em peixes de águas frias profundas, como salmão, atum e truta, em alguns vegetais como a linhaça, agrião, brócolis e espinafre, e em menor quantidade em frutos do mar. Já os ácidos graxos ω -6 podem ser encontrados em óleos vegetais como de girassol, canola, milho e soja, no leite de cabra e vaca, no abacate, além de na maioria das amêndoas (MARTIN *et al.*, 2006).

Os lipídeos com 18 carbonos que pertencem a essas famílias: ácido α -linolênico (18:3 n-3) e ácido linoléico (18:2 n-6) usam as mesmas enzimas dessaturases e uma alongase para sintetizar seus derivados com 20 átomos de carbonos: ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido aracdônico (AA) (GARÓFOLO; PETRILLI, 2006), observado na figura 2.

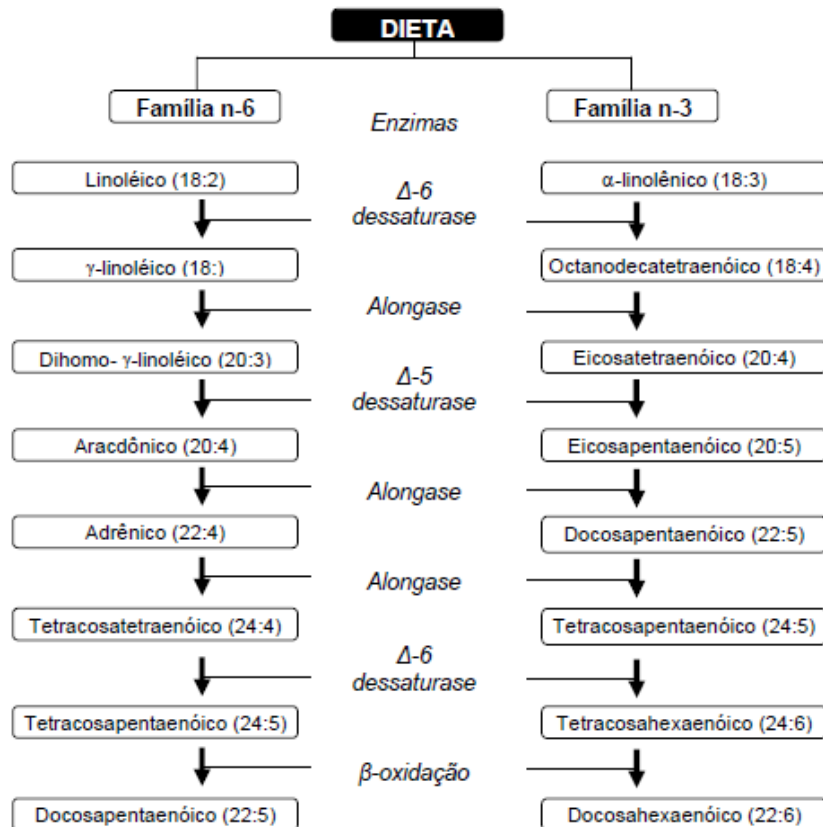


Figura 2 - Etapas bioquímicas para síntese dos ácidos graxos.
Fonte: LAURITZEN *et al.*, (2001).

Elas possuem maior afinidade pelos ácidos da família ω -3, porém a conversão do ácido α -linolênico em AGPI's de cadeia longa sofre grande influência dos níveis de ácido linoléico na dieta.

Existem duas vias de metabolização: a via cicloxigenase, para formação de prostaglandinas e tromboxanos, e a via lipoxigenase, a qual leva à síntese de leucotrienos (ALBERTS *et al.*, 2004). Embora o AA seja preferencialmente metabolizado pela via da ciclooxygenase, a presença do EPA inibe competitivamente esta via, portanto uma ingestão aumentada de ω -3 resulta na diminuição de AA. Isso gera aumento das prostaglandinas e tromboxanos derivados do EPA, que têm menor potencial inflamatório em comparação aos do AA (FEDOROVA; SALEM Jr, 2006). Desse modo, as quantidades relativas das duas famílias de ácidos graxos providas pela dieta e presentes nos tecidos são de grande importância, tendo sido demonstrado por Simopoulos (2002) que as mudanças na dieta com o passar dos tempos interferiu diretamente nas funções biológicas e metabólicas, com implicações importantes à saúde quando há um desequilíbrio quantitativo na ingestão de ácidos graxos ω -3 e ω -6 na dieta humana. Esta passou a ter uma quantidade desproporcional de ω -6, uma vez que a alimentação “moderna” é muito rica neste ácido graxo. Ainda, soma-se o fato de haver pouca ingestão de alimentos ricos em ω -3, fazendo assim destes ácidos graxos o alvo de nossa investigação.

1.1.4 Ácidos graxos ω -3 x gestação e lactação

No período de gestação, ocorre transferência dessas substâncias da mãe para o feto, sendo continuada após o nascimento através do aleitamento, havendo necessidade da mãe adaptar seu metabolismo para dar suporte às necessidades energéticas do feto, e posteriormente o bebê. Além disso, os AGPI's também podem ser usados para atender à demanda de energia imediata (CHEN; CUNNANE, 1993), indicando-se aumento de sua ingestão nesse período, bem como nos primeiros meses após o nascimento do bebê (KOLETZKO; CETIN; BRENNAN, 2007). Esta quantidade influencia claramente a transferência de ácidos graxos para o bebê, antes e depois nascimento, e estes por sua vez desempenham um papel importante no crescimento e desenvolvimento infantil, pronunciadamente durante o

desenvolvimento do sistema nervoso no início da vida (LAPILLONNE; CLARKE; HEIRD, 2003; INNIS, 2000). O último trimestre da gestação e os primeiros meses de vida do bebê compõe um período de crescimento cerebral intenso, com aumento de sinapses e arborizações dendríticas (LAURITZEN *et al.*, 2001), e aumento principalmente de ácido araquidônico e ácido docosahexaenóico (DHA, que é derivado do EPA), sendo estes os principais ácidos graxos componentes das membranas neuronais. Sua deposição depende exclusivamente da transferência placentária antes do nascimento (LITTLE *et al.*, 2007), mecanismo que, apesar de ainda não totalmente esclarecido, provavelmente envolva um processo seletivo, o que ocorreria através de acoplamento à algumas proteínas seletivas. Os principais produtos atravessados por ela são DHA e AA, realizando liberação desses componentes para a circulação fetal, seguido de transporte para o fígado (no caso do DHA) onde é esterificado e secretado novamente nas lipoproteínas (INNIS, 2007; LAURITZEN *et al.*, 2001; INNIS, 2003). A amamentação pode ser recomendada como método preferido de alimentação de bebês, inclusive para prematuros, pois fornece ácidos graxos poli-insaturados pré-formados, mas apesar disso, a concentração de DHA no leite humano e suplementações pós-natais podem não ser capazes de compensar um déficit de DHA ocorrido durante a vida intra-uterina (LAPILLONNE; JENSEN, 2009).

Durante esse período ocorre ainda o risco do desenvolvimento de depressão perinatal, fato que poderia estar associado à quantidade de ácidos graxos apresentados pela mãe. Estudos vêm tentando utilizar tratamentos alternativos para seu tratamento, uma vez que os medicamentos ditos convencionais podem ter efeitos indesejados para o feto e para a mãe, devendo ser usados com cautela. Dentre as possíveis alternativas encontram-se uso de ω -3, folato e exercícios, porém ainda não há dados suficientes para indicação isolada de qualquer um deles (FREEMAN, 2009). Dados epidemiológicos e pré-clínicos dão suporte ao papel dos ácidos graxos ω -3 na depressão perinatal, sendo que dois estudos pilotos sugeriram boa tolerabilidade e potencial eficácia no seu tratamento (CHIU *et al.*, 2003; FREEMAN *et al.*, 2006).

1.1.5 Ácidos graxos ω -3 x depressão

Alterações no perfil lipídico da dieta e sua incorporação nas membranas neurais vêm sendo envolvidas no desenvolvimento da depressão. Isso se deve ao fato de diferentes estudos epidemiológicos apontarem menor ocorrência de depressão na população de países como o Japão, Chile e Coréia, os quais apresentam consumo regular de peixe na alimentação (PEKANIN *et al.*, 1989; DE VRIESE; CHRISTOPHE; MAES, 2003).

Também foi demonstrado que pacientes com depressão maior apresentam deficiência de ω -3, tanto no plasma quanto na composição das membranas das hemácias (LIN; HUANG; SU, 2010; McNAMARA; CARLSON, 2006; WILLIAMS *et al.*, 2006; VENNA *et al.*, 2009; ROSS, 2007), assim como o desbalanço na proporção ingerida de ω -6/ ω -3 compondo o quadro patológico (PEET *et al.*, 1998; LIN *et al.*, 2010; EDWARDS *et al.*, 1998).

A partir dos dados expostos anteriormente, o uso do óleo de peixe como possível agente antidepressivo é um tema em evidência. Vários estudos apontam nessa direção (CALDER, 1998; VENNA *et al.*, 2009; WILLIAMS *et al.*, 2006; PEET *et al.*, 1998; SONG; ZHANG; MANKU, 2009; LIN *et al.*, 2010; DA SILVA *et al.*, 2008).

Há também indicação de neuroproteção, associando um alto consumo de DHA com menores riscos de desenvolvimento de doenças como Alzheimer e Parkinson (CALON; COLE, 2007; SU *et al.*, 2008). Delattre *et al.* (2010) investigou a ação do ω -3 em um modelo de doença de Parkinson feito com 6-hidroxidopamina (6-OHDA), encontrando diminuição no comportamento rotacional, sugerindo efeitos de neuroproteção.

Há ainda, comprovação de efeitos antiinflamatórios do ω -3 (LAYÉ, 2010; KHAN, 2010; REINOLDS; ROCHE, 2010; KUBERA *et al.*, 2010; CALDER, 1998).

No que se refere aos efeitos antidepressivos, o primeiro estudo de nosso laboratório a mostrar comportamento antidepressivo nos animais de laboratório envolveu suplementação com óleo de peixe durante a gestação e lactação (através das matrizes), tendo sido encontrado aumento da concentração de DHA e EPA no leite das matrizes, assim como no hipocampo e córtex frontal dos animais jovens (NALIWAICO *et al.*, 2004). Em outro estudo, foram utilizadas duas janelas temporais diferentes. Uma com suplementação de forma indireta na gestação e lactação, ou

seja, as fêmeas matrizes eram suplementadas, e os filhotes recebiam o óleo de peixe através da placenta, e posteriormente através da amamentação. A outra, de forma direta após a lactação, ou seja, os filhotes eram suplementados diretamente via oral. Observou-se que o óleo de peixe foi capaz de prevenir o aparecimento de comportamento depressivo na vida adulta (FERRAZ *et al.*, 2008). Em outro estudo realizado em pacientes parkinsonianos, Da Silva *et al.* (2008) demonstrou efeito antidepressivo do óleo de peixe em comparação ao grupo placebo.

Embora os mecanismos pelos quais ocorra esse efeito ainda não estejam elucidados, há evidências que indicam envolvimento do sistema serotoninérgico e noradrenérgico (INNIS, 2000; BORSONELO e GALDUROZ, 2008). Um estudo recente de Venna *et al.* (2009) mostrou associação entre dieta enriquecida com ω -3 e alteração desses sistemas através do teste da natação forçada. Porém, ainda havia necessidade de demonstrar o mecanismo de ação através do qual o ω -3 estaria exercendo esse efeito antidepressivo. Neste sentido, visando uma investigação dos mecanismos antidepressivos, um trabalho utilizando para-clorofenilalanina (PCPA), um inibidor da síntese de serotonina, demonstrou o envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito antidepressivo encontrado, particularmente no hipocampo. Além disso, foi detectado acréscimo na expressão de BDNF no córtex cerebral e hipocampo dos animais suplementados (VINES *et al.*, 2012).

Apesar do teste de natação forçada modificado (utilizado no estudo supracitado) ser uma ferramenta válida para indicar um comportamento antidepressivo, ele não pode ser considerado um modelo de depressão. Para estudo dessa patologia, assim como outras desordens psiquiátricas, os modelos animais são uma ferramenta útil e válida, possibilitando estudar as alterações moleculares no tecido cerebral (não realizado em humanos), eliminando diversas variações ambientais, inferindo uma maior fidedignidade aos resultados encontrados (HELLWEG *et al.*, 2007; SONG; LEONARD, 2005).

1.1.6 Modelos animais de estudo

Em 1969 foram estabelecidos os primeiros critérios amplamente aceitos para um modelo animal de depressão, sendo o requisito mínimo proposto: a) semelhança no comportamento do animal com sinais observados em pacientes com depressão; b) as mudanças comportamentais que ocorrem no animal devem poder ser medidas objetivamente; e c) as mudanças de comportamento podem ser revertidas por qualquer tratamento que seja terapeuticamente eficaz (WILLNER, 1984; SONG; LEONARD, 2005).

Apesar da incapacidade de serem verificados em ratos sinais como baixo-astral, anedonia, sentimento de culpa, pensamentos de suicídio, por estes serem espécie-específicos (SONG; LEONARD, 2005), a confirmação do estado depressivo é feita através de diferentes testes, que avaliam comportamentos relacionados à depressão (ZUEGER *et al.*, 2005). Dentre os modelos de depressão mais utilizados encontram-se: bulbectomia olfatória, indução por interleucinas 1- β (IL-1 β), estresse social, derrota social, choque nas patas (SONG; WANG, 2010) e estresse crônico mediano (WILLNER, 1997).

1.1.7 Bulbectomia olfatória

O modelo da bulbectomia olfatória (OBX) bilateral tem sido amplamente utilizado, pois promove alterações comparáveis às vistas em pacientes com depressão maior em vários sentidos: comportamentais, neuroendócrinas, neurobiológicas e neuroimunológicas (PRIMEAUX; BARNES; BRAY, 2007; ZUEGER *et al.*, 2005). As principais alterações são hiperatividade, déficit no aprendizado espacial, déficit na memória, aversão condicionada ao paladar, alteração nos comportamentos motivados por comida, diminuição da libido, piora no comportamento de esquiva, hiper-responsividade ao estresse (SATO *et al.*, 2010; HELLWEG *et al.*, 2007; HARKIN; KELLY; LEONARD, 2003; SONG; LEONARD, 2005; DEUSSING, 2006), ocorrendo normalmente duas semanas após realização do procedimento cirúrgico (MUCIGNAT-CARETTA; BUNDÍ; CARETTA, 2006).

Há uma lesão retrógrada em todos os sistemas dos quais os bulbos recebem e/ou enviam informações (figura 3).

Foram observadas reduções no número de espinhos dendríticos e de sinapses no córtex piriforme, além de redução da densidade dendrítica nas áreas CA1, CA3 e giro denteado no hipocampo, além de uma certa quantidade de morte neuronal, alterações essas que são também encontradas em pacientes com depressão (HARKIN; KELLI; LEONARD, 2003).

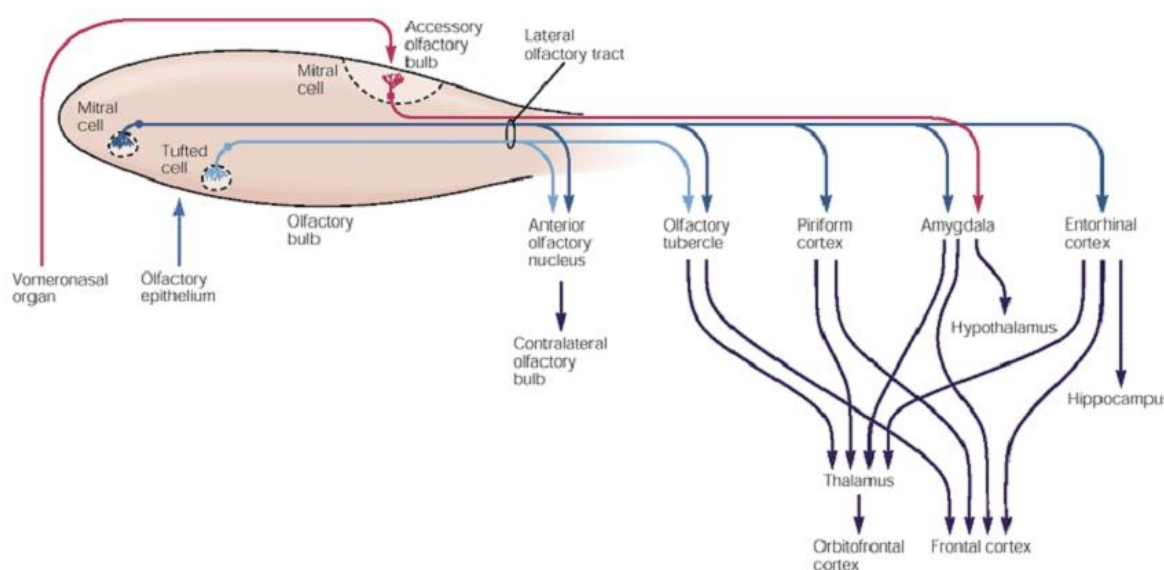


Figura 3 - Bulbo olfatório e suas conexões.

Fonte: Principles of Neural Science, 4ed.

Nos ratos bulbectomizados, ocorre diminuição da liberação de serotonina, noradrenalina e dopamina (SATO *et al.*, 2010; ZUEGER *et al.*, 2005; SONG; LEONARD, 2005). Dentre estes neurotransmissores, observa-se uma marcada diminuição de serotonina no córtex frontal, a qual gera aumento de transportadores e da enzima passo limitante para a formação deste neurotransmissor, a triptofano hidroxilase, refletindo uma tentativa de melhorar a função serotoninérgica alterada em decorrência da degeneração neuronal induzida pela bulbectomia. Estas alterações serotoninérgicas têm sido associadas às alterações comportamentais decorrentes da bulbectomia (HARKIN; KELLI; LEONARD, 2003; SONG; LEONARD, 2005). Há alterações no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, aumento das citocinas pró-inflamatórias e fator de necrose tumoral, diminuição da neurogênese hipocampal, cortical e da amígdala, e/ou diminuição de seus volumes, e ainda

neurodegeneração, podendo ocorrer também alargamento ventricular (SONG; WANG, 2010; SONG; ZHANG; MANKU, 2009). Em relação aos níveis de BDNF, ainda não há um consenso, com apresentação de estudos em que os níveis estão reduzidos após a bulbectomia (HENDRIKSEN *et al*, 2012) assim como outros verificando ocorrência de aumento de BDNF após a realização do procedimento cirúrgico (HELLWEG *et al*, 2007; SOHRABJI; PEPPLES; MARROQUIN, 2000).

Uma limitação do modelo de bulbectomia é o fato de mimetizar particularmente um estado depressivo agitado, ansioso, ao invés de uma depressão semelhante à encontrada na fase depressiva bipolar, por exemplo (SONG; LEONARD, 2005; DEUSSING, 2006). É também utilizado eficientemente no estudo da relação entre inflamação e neurodegeneração, simulando eficientemente estados iniciais da doença de Alzheimer (SONG; WANG, 2010; BORRE *et al.*, 2012).

2 JUSTIFICATIVA

O fato de que a suplementação com ω -3 durante as fases de gestação e lactação tem proporcionado efeitos antidepressivos em indivíduos experimentais na fase adulta, mesmo sem suplementação continuada durante este período, demonstra que esta é uma fase extremamente apropriada para estudos envolvendo efeitos antidepressivos.

Somando-se a esses fatos, há o conjunto de trabalhos desenvolvidos em nosso laboratório que apontam fortemente para um efeito antidepressivo do ω -3 apresentar envolvimento com o sistema serotoninérgico.

No entanto, estes estudos utilizaram o Teste de Natação Forçada Modificado, que apesar de ser capaz de demonstrar comportamento depressivo, não pode ser considerado um modelo de depressão.

Tendo em vista a ausência de estudos avaliando o efeito da suplementação com ω -3 em modelos animais de depressão, e que a bulbectomia olfatória é validada e amplamente aceita, o objetivo dessa pesquisa foi investigar os efeitos dos ácidos graxos ω -3 em indivíduos adultos, os quais receberam essa substância somente durante sua formação e posterior lactação, após terem sido submetidos a um modelo de depressão (bulbectomia olfatória) no período de vida adulta.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve por objetivo geral investigar o efeito do DHA e EPA, presentes no óleo de peixe, sobre a depressão e memória e sobre alterações neuroquímicas em ratos submetidos ou não ao modelo de depressão da bulbectomia olfatória.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito do óleo de peixe sobre comportamento depressivo, através dos testes de natação forçada modificado, em ratos submetidos ou não à depressão pelo modelo da bulbectomia;
- Avaliar o efeito do óleo de peixe sobre a memória, através do teste de reconhecimento de objetos, em ratos submetidos ou não à depressão pelo modelo da bulbectomia;
- Avaliar, através dos testes do labirinto em cruz elevado e campo aberto, possíveis implicações comportamentais do citado tratamento sobre a emocionalidade e comportamento motor dos animais experimentais;
- Dosar os níveis de serotonina e seu metabólito ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) no córtex cerebral e hipocampo de ratos suplementados ou não com óleo de peixe, submetidos ou não ao modelo de depressão da bulbectomia;
- Quantificar o Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo (BDNF - *Brain Derivated Neurotrophic Factor*) no hipocampo de animais submetidos ou não ao modelo de depressão da bulbectomia;
- Identificar e quantificar os ácidos graxos presentes no hipocampo de animais submetidos ou não à bulbectomia olfatória, através do método de cromatografia gasosa.

4 MANUSCRITO

Fish oil improves anxiety-, depressive-like and cognitive behaviors in olfactory bulbectomized rats

Claudia Pudell^a, Bianca Arão Vicente^a, Ana Marcia Delattre^a, Bruno Carabelli^a, Marco Aurélio Mori^a, Deborah Suchecki^b, Ricardo B. Machado^b, Sílvia M. Zanata^c, Jesuí Vergílio Visentainer^d, Oscar de Oliveira Santos Junior^d, Marcelo M. S. Lima^a, Anete Curte Ferraz^{a*}

^aLaboratório de Neurofisiologia, Departamento de Fisiologia, Universidade Federal do Paraná, 81.531-990 Curitiba, PR, Brazil.

^bDepartamento de Psicobiologia, Universidade Federal do São Paulo, 04024-002 São Paulo, SP, Brazil

^cLaboratório de Neurobiologia, Departamento de Patologia Básica, Universidade Federal do Paraná, C.P. 19.031, 81.531-990 Curitiba, PR, Brazil.

^dLaboratório de Química de Alimentos, Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, 87.020-900 Maringá, PR, Brazil.

*Corresponding author. Tel:+55(41)3361-1722; Fax:+55(41)3361-1714; E-mail: anete@ufpr.br

1. Introduction

Animal models of depression have been developed as a way to study the neurobiology of this pathology and to test new therapeutic approaches (Nester et al., 2009). One of these models is the olfactory bulbectomy (Obx) (Song and Leonard 2005), which mimics behavioral, physiological and neurochemical features of depression, such as deficits in learning and memory, reduced food-motivated behavior, reduced libido and stress hyperresponsiveness (Harkin 2003; Song and Leonard 2005; Deussing 2006; Hellweg, Zueger et al. 2007; Sato, Nakagawasai et al. 2010). These changes are usually observed two weeks after the surgery (Mucignat-Caretta, Bondi et al. 2006) and are reversed by chronic, but not acute, antidepressant treatment (Harkin 2003; Song and Leonard 2005; Song and Wang 2010). Specifically, Obx produces a progressive degenerative process in limbic areas and also produces neurodegeneration in the locus coeruleus and dorsal raphe that causes dysfunction of the noradrenergic or serotonergic system, respectively (Harkin 2003; Canbeyli 2010). Bulbectomized animals show varied behavioral changes including impairment of cognitive function and increased locomotor activity and exploratory behavior (Harkin 2003; Breuer, Groenink et al. 2007; Sato, Nakagawasai et al. 2010). The Obx is widely accepted as a model of depression with many similarities to the agitated form of human depression (Harkin 2003). In addition, drugs used for the treatment of Alzheimer's disease alleviate the cognitive impairments induced by Obx, so this procedure may also be useful for modeling Alzheimer's disease with depressive symptoms (Borre, Bosman et al. 2012).

It has been postulated that deficiency of omega-3 polyunsaturated fatty acids (ω -3 PUFA), such as eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA), could play a role in the pathophysiology of a wide range of psychiatric disorders as mood and hyperactivity disorders, Alzheimer's disease and dementias (McNamara and Carlson 2006; Calon and Cole 2007; Borsonelo and Galduroz 2008; da Silva, Munhoz et al. 2008; Colangelo, He et al. 2009). Chronic fish oil supplementation (rich in DHA and EPA) exclusively during pre- and postnatal development decreases behavioral despair in the modified forced swim test (MFST) and increases the performance in the water maze of the adult offspring, thus suggesting a long-term antidepressant and cognitive-enhancer effect of fish oil (Ferraz, Kiss et al. 2008; Ferraz, Delattre et al. 2011). In fact, a similar antidepressant

effect induced by fish oil supplementation during pregnancy and lactation was detected in adult rats, possibly related to a concomitant induction of brain derived neurotrophic factor (BDNF) expression and increased cortical and hippocampal serotonin neurotransmission (Vines, Delattre et al. 2012).

Considering the novelty of effects promoted by the fish oil supplementation, the present study was devoted to evaluate the antidepressant-like and cognitive-enhancing properties of ω -3 PUFA supplementation in the Obx depression model. To this end, we investigated the effects of fish oil supplementation (from conception to weaning) on behavioral impairments induced by Obx in 3-month old rats subjected to open field test (OF), modified forced swimming test (MFST), elevated plus maze test (EPM) and object location task (OLT).

After the behavioral tests, the neurochemical analysis was carried out in 102 day-old offspring in order to quantify hippocampal levels of BDNF, dopamine (DA), serotonin (5-HT) and their metabolites, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) and 5-hydroxyindoleacetic (5-HIAA).

2. Methods

2.1. Animals

Male and female Wistar rats were kept under a 12 h light /12 h dark cycle (lights on at 07:00 am) in a controlled temperature room (21 ± 2 °C), with food (rat chow, Nuvital Nuvilab CR1- Nuvital Nutrientes S/A, Colombo, Paraná, Brazil) and water *ad libitum*. All experiments were approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of the Universidade Federal do Paraná (# 512) and were performed according to the Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care).

2.2. Experimental design

For this experiment, 10 week-old virgin female Wistar rats were used as matrices to obtain the male offspring for subsequent tests. The female rats were

randomly distributed in 2 experimental groups: control group (C, n=20) and fish oil supplemented group (FO, n=20). Females of the C group received regular chow diet, whereas those of the FO group were fed with the same chow, and a daily supplementation of 3.0 g/kg of fish oil containing 12% of EPA and 18% of DHA (kindly donated by Laboratório Herbarium Botânico S/A, Colombo, Paraná, Brazil) was given orally (through gavage). The fatty acid composition of chow diet was the same as that presented in a recent report from our group (Ferraz, Delattre et al. 2011). The FO group was supplemented during an adaptation period (14 days), mating (8 days), pregnancy (21 days) and nursing (21 days). After weaning, 10 pups animals (5 from control and 5 from supplemented matrices) were decapitated and their hippocampus were removed to perform an lipid profile. The remaining males of the offspring were kept in the animal facility, under the same environmental conditions as described above, until adulthood (80 days), and was not subjected to further supplementation by any means. To avoid intragroup interference, only two pups of each matrice were used, being distributed among sham or operated group, for both supplemented as for control group. These animals were randomly redistributed in another two groups: olfactory bulbectomy (Obx) and sham-operated (Sham), making up for four groups: Control (C, n=20), Fish Oil (FO, n=20), Olfactory bulbectomy (Obx, n=15) and Olfactory bulbectomy Fish Oil (ObxFO, n=15). All groups were assessed for motor, depressive-like, anxiety-like behaviors and memory, by means of, respectively, open-field (OF), Modified Forced Swimming Test (MFST), Elevated Plus Maze (EPM) and Object Location Task (OLT). After the behavioral tests, rats were decapitated and the hippocampuses were dissected, to investigate long-term effects of ω -3 PUFA on BDNF, DA e 5-HT content and their metabolites, and also lipid profile. For more details of the complete experimental design see Figure 1.

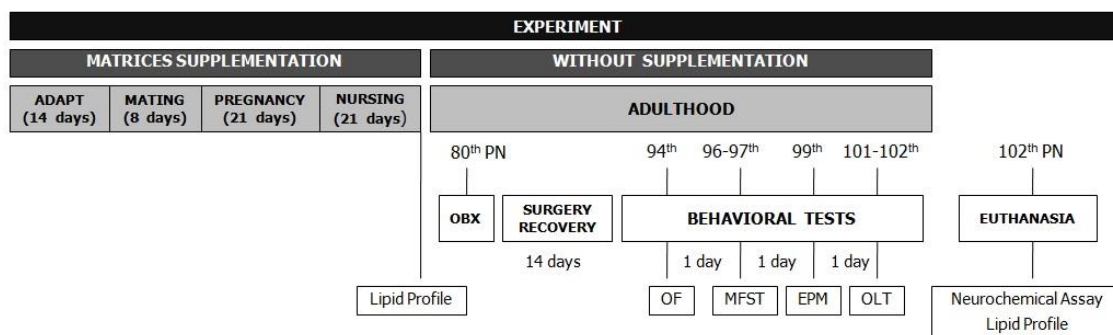


Figura 4 - Time line showing experimental design. The bars are not represented in scale. Obx: olfactory bulbectomy; OF: open field; MFST: modified forced swimming test; EPM: elevated plus maze; OLT: object location task.

2.3. Surgery

Animals undergoing either olfactory bulbectomy or sham surgery were previously anesthetized with Xilazine (60 mg/kg, i.m.; Syntec do Brasil Ltda) and Ketamine (4mg/kg, i.m.; Syntec do Brasil Ltda). The Olfactory bulbectomy surgery (Obx) was performed by making a 2-cm-rostral-caudal midline incision in the scalp, and burrs were drilled into the skull 8mm rostral of bregma and 2mm lateral of midline, and also 3,5mm rostral of bregma and 2mm lateral of midline, aiming to open a window in the rat skull, to successfully access the olfactory bulb (modified from (Cairncross, Cox et al. 1978)). These structures were removed by aspiration and the skin sutured, whereas sham-operated animals were just sutured, with the olfactory bulbs left intact. All animals were placed under a heat lamp until recovery, kept isolated for 2 days, and then returned to their home cages. When physical damage in the frontal cortex, as well as remaining bulb tissue was observed in the moment of decapitation, these animals were excluded.

2.4. Open Field Test

The open-field test was performed in a circular arena (1 m diameter) limited by a 40 cm-high wall and illuminated by four 60 W lamps (Broadhurst 1960). The

arena's floor was black, with no apparent divisions. The subjects were individually placed in the central area, and allowed to freely explore the arena for 5 minutes. During this period, the Smart® Junior System (Panlab, Harvard Apparatus, Spain) was used to measure the subject's locomotion behavior, by analyzing distance run and velocity, and time spent in each area of the OF (central, middle and periphery). The open-field was cleaned with a 5% water-ethanol solution before each behavioral testing to eliminate possible bias due to odors left by previous rats.

2.5. *Modified forced swim test*

This test is a modified version of the Porsolt test (Porsolt, Le Pichon et al. 1977) and was carried out as previously described (Detke, Rickels et al. 1995; Cryan, Page et al. 2002). Briefly, rats were placed, individually, in an opaque plastic cylinder (diameter 20 cm; height 50 cm) containing water up to 30 cm ($24 \pm 1^\circ\text{C}$); on day 1 the rats remained in the cylinder for 15 min (training session) and 24 h later they were placed back and tested for 5 min (test session). The test session was video recorded via a camera positioned above the cylinder for subsequent analysis. The behaviors assessed during the test session were: immobility (when the rat stopped all active behaviors and remained floating in the water with minimal movements, with its head just above the water), swimming (movements throughout the swim cylinder) and climbing (upward directed movements of the forepaws along the cylinder walls). During the 5 min session, the predominant behavior within each 5-s interval was recorded. The water was changed and the cylinder rinsed with clean water after each session. After the training and the test sessions, the animals were dried and placed in their home cages.

2.6. *Elevated plus maze test*

The elevated plus maze, a test used to assess anxiety-like and exploratory behaviors, consists of two opposite open arms and two opposite closed arms (45 x 15 cm) connected by a central area (15 x 15 cm), elevated 70 cm above the floor and located in an appropriate observation room. The test was performed under dim light

conditions. The rat was placed in the central square, and its behavior was observed for 5 min. During that time, the number of open- and closed-arm entries was measured as well as the time the animal spent in each arm (Pellow, Chopin et al. 1985). After each animal was tested, the elevated plus maze was cleaned with a 10% ethanol solution in order to avoid possible interferences caused by the previous animal's odors or residues.

2.7. *Object Location Task*

This test was performed as previously described (Ennaceur, Michalikova et al. 2005) and consisted of two phases. In the first day, an open box made of PVC (width = 80cm; length = 80cm; height = 50cm) was used, and two identical objects were placed in the back corners, 10cm away from the sidewall, and the animals placed facing away the objects. The subject was allowed to explore the ambient for 3 minutes, and placed back in its home-cage. After a 15 minute delay, they rat was reintroduced in the box, and allowed to explore it for another 3 minutes. This process was repeated 5 times (3 min each) with a 15 minute interval between each exposure.

The second phase, performed 24 h later, consisted of placing the rat in the box for 3 min, but after a 15-min interval, one of the objects was placed in a different location (diagonally). In this test trial, the frequency and total duration of approaches were analyzed. A discrimination index was also considered to evaluate possible memory deficits, calculated by the following equation: $[(\text{TNP}-\text{TOP}) / (\text{TNP}+\text{TOP}) * 100]$, where TNP is the time spent in the new position and TOP is the time spent in the old position.

2.8. *Neurochemical quantification*

The animals were decapitated and their brains were removed and the hippocampus were dissected on a cold surface. The tissue samples were weighed individually and homogenized by sonication in 500 mL of extraction solution (0.1 M perchloric acid containing 0.4 mM sodium metabissulfite and 0.2 mM ethylenediaminetetraacetic acid). The homogenates were centrifuged at 20,000 x g

for 10 min, then filtered through 0.22mm membrane and stored at -80° C for further analysis. Precipitates were dissolved in 0.1 N NaOH and assayed for protein estimation (Bicinchoninic acid method, Pierce Chemical, Rockford, IL). Supernatants were submitted to fast isocratic separation through a C18 HPLC reversed-phase column system (Spheri-5, C18, ODS, 5 mm, 25 cm, 4.6 mm column; linked to a New-Guard Cartridge Column, RP-18, 7 mm pre-column; Perkin Elmer Brownlee Columns, Shelton, CT) and electrochemically detected using an amperometric detector (L-ECD-6A, Shimadzu, Japan), by oxidation on glass carbon electrode at +850 mV in relation to an Ag-AgCl reference electrode (Machado, Tufik et al. 2008). The mobile phase consisted of 0.163 M citric acid, 0.06 M sodium phosphate dibasic anhydrous, 0.69 mM octyl sodium sulfate, 12 mM ethylenediaminetetraacetic acid, acetonitrile 4%, tetrahydrofuran 1.7% and orthophosphoric acid sufficient to bring the pH to 2.85, diluted in double distilled water. The mobile phase was filtered through a 0.2 mm filter membrane, degassed under vacuum and delivered at a flow rate of 1.2 mL/min (HITACHI Pump System L-7100). Each sample was analyzed in duplicate for concentrations of dopamine (DA), serotonin (5-HT) and their non-conjugated metabolites 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), homovanilic acid (HVA) and 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA). The recovery of the analytes was determined by adding a fixed concentration of internal standard DHBA (dihydroxybenzylamine) before tissue homogenization. An automatic injector (HITACHI L-7250, cut injection method) was utilized to improve the reproducibility of injections. All standards and salts were purchased from Sigma (USA) and the solvents (HPLC grade) were purchased from J.T. Baker (USA).

2.9. *BDNF Immunoassay*

Quantification of endogenous BDNF was performed with a two-site enzyme-linked immunosorbent assay using the method of BDNF extraction from rat brain tissue described by Elfving and co-workers (Elfving, Plougmann et al. 2010). For this parameter, animals from each experimental group were killed by decapitation and the hippocampus was rapidly dissected, placed on dry ice and stored at -80°C. Prior to analysis, the initial tissue homogenization (volume 1:10 w/v) with lysis buffer containing 100 mM Tris-HCl (pH 7.2), 400mM NaCl, 4mM ethylenediaminetetraacetic

acid, 0.05% sodium azide, 0.5% gelatin, 0.2% Triton X 100, 2% BSA, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1mM N-ethyl-maleimide and 2,5mM Phenantroline was performed by short sonication pulses for 15 s. After 40 min on ice the homogenates were centrifuged (11,000 x g, 20 min, 4°C) and the supernatant was collected. Dilutions of hippocampus (1:12) extracts were used for the analysis of BDNF concentration (Elfving, Plougmann et al. 2010) that was measured using the Promega BDNF Emax Immunoassay System (Promega Co., Madison, WY, USA) according to the manufacturer's instructions. Briefly, 96 wells polystyrene plates were coated with anti-BDNF monoclonal antibody (mAb) in carbonate buffer pH 9.2 overnight at 4°C. Unadsorbed mAbs were washed with phosphate buffer saline containing 0.05% Tween 20 (PBST) and plates were blocked with Promega Block and Sample Buffer for 1h at room temperature. Next, 100µl of each sample were added in triplicate and plates were incubated for 2h at room temperature. After extensive washing with PBST, anti-human BDNF polyclonal antibody was added and further incubated for 2h at room temperature (RT). Finally, unbound antibodies were removed by washing with PBST and anti-IgY horseradish peroxidase conjugate was added for 1h at RT. Reaction was developed using TMB One Solution and stopped with 1 M HCl. Absorbance was measured at 450nm.

2.10. Lipid Profile

Total lipids were extracted with a chloroform-methanol-water mixture (Bligh and Dyer, 1959). Total lipid transesterification was performed according to Joseph and Ackman (1992). Twenty five mg (\pm 0.1 mg) oil were weighed and added to 1.5 mL of 0.50 mol of NaOH / L methanol. The mixture was heated in a 100°C bath for 5 min and then cooled to RT. Two ml of a solution of boron trifluoride (BF₃) 12% in methanol were added and heated again in a 100°C bath for 30 min. Then, the tube was cooled in flowing water at RT and 1 ml of isooctane was added. After vigorous stirring for 30 s, 5.0 mL of saturated sodium chloride were added. The esterified sample was allowed to stand for better phase separation. After collection of the supernatant, 1.0 ml of iso-octane was added to the tube, stirred, collected and added to the previous fraction. The sample was concentrated to a final volume of 1.0 ml for subsequent injection into the gas chromatograph.

The fatty acids esters were separated by gas chromatography Thermo (Ultra Trace 3300), equipped with a flame ionization detector and capillary column of fused silica CP - 7420 (Select FAME 100 m long, 0.25 mm diameter and 0.25 mm in inner cyanopropyl). H₂ flow (carrier gas) was 1.2 mL / min, 30 mL of min N₂ (make up) and 35 to 300 mL / min for the H₂ and synthetic air to the flame detector. The injected volume was approximately 2.0 µL, using sample splitting 1:80, with the injector and detector temperatures of 220 to 230°C respectively, while the column 165°C for 18 min and increased to 235°C with 4°C/min rate, maintained for 14.5 min. The percentages were determined by Integration of peak areas by Chronquest Software version 5.0. The labels were performed using the criterion of comparison of retention time of methyl esters of standards from Sigma (USA) with the sample and through co-dilution standards of known composition.

2.11. *Statistical analysis*

Differences among groups in the behavioral and biochemical tests were analyzed by two-way analysis of variance (ANOVA) – with supplementation as the between-subjects factor and Olfactory Bulbectomy as the within-subjects factor - followed by Duncan's test or Student's t test. The results are reported as mean \pm S.E.M. Differences were considered statistically significant when $p \leq 0.05$.

3. Results

3.1.1 *Open Field Test*

Figure 2 shows total distance (A), peripheral distance (B), central distance (C), time in periphery (D) and velocity (E). Two way ANOVA showed a main effect of condition in total distance [$F(1,66) = 5.47$; $p \leq 0.02$], peripheral distance [$F(1,66) = 8.35$; $p \leq 0.005$], time spent in periphery [$F(1,66) = 4.85$; $p \leq 0.03$], and velocity [$F(1,66) = 4.93$; $p \leq 0.03$], as well as an interaction between treatment and condition [$F(1,66) = 6.56$; $p \leq 0.01$], [$F(1,66) = 8.45$; $p \leq 0.004$], [$F(1,66) = 7.73$; $p \leq 0.007$] and [$F(1,66) = 4.02$; $p \leq 0.04$], respectively. Nevertheless, there was no effect of fish oil

supplementation in total distance [$F(1,66) = 0.24$; $p=0.62$], peripheral distance [$F(1,66) = 1.61$; $p=0.21$], , time in periphery [$F(1,66) = 0.93$; $p=0.34$] and velocity [$F(1,66) = 1.24$; $p=0.27$]. Regarding to central distance there was no effect in treatment [$F(1,66) = 2.14$; $p=0.15$], condition [$F(1,66) = 1.69$; $p=0.19$] or interaction between these two factors [$F(1,66) = 0.91$; $p=0.34$].

Post hoc test indicated that Obx induced an increase in all four parameters compared to C and ObxFO groups (p 's ≤ 0.02).

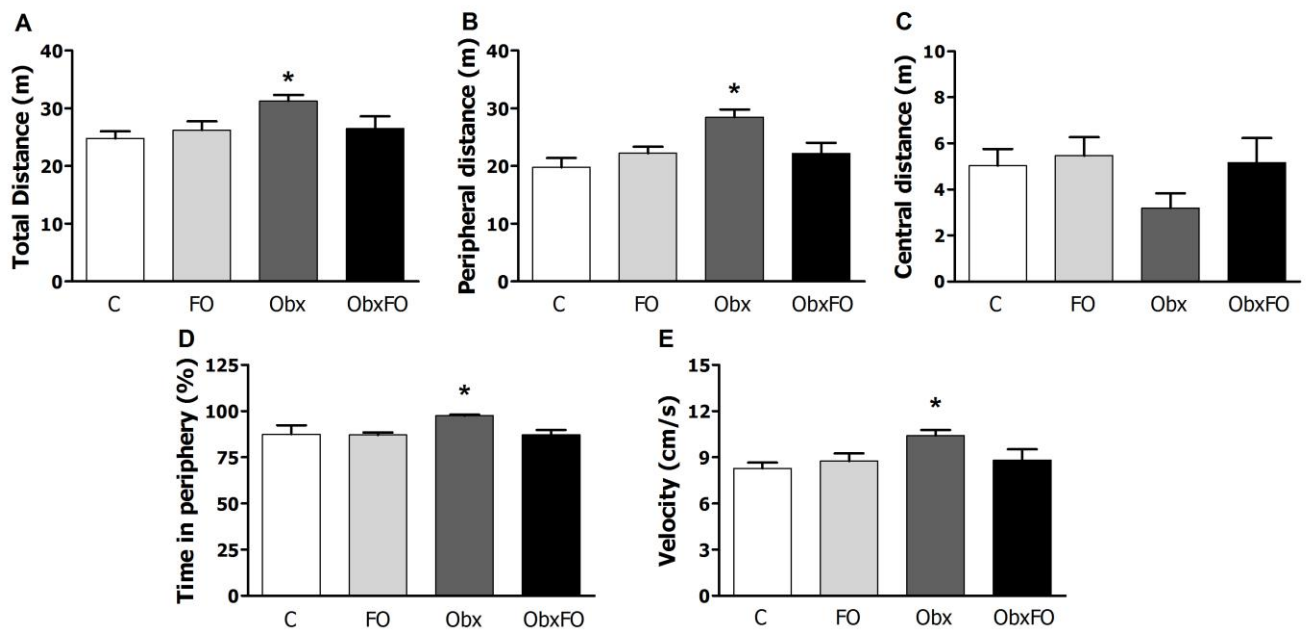


Figure 5 - Open Field Test. (A) Total distance; (B) Peripheral distance; (C) Central distance; (D) Time in periphery and (E) Velocity. Control (C) $n = 20$; Fish Oil (FO) $n = 20$; Bulbectomized (Obx) $n = 15$; Bulbectomized Fish Oil (ObxFO) $n = 15$; Two-way ANOVA followed by Duncan's post hoc test. Values are expressed as mean \pm S.E.M. * $p \leq 0.02$ comparing Obx with C and ObxFO groups.

3.1.2. Modified Forced Swim Test

In this test we analyzed three parameters: immobility, swimming and climbing (Fig. 3). Regarding immobility, there was no effect of condition [$F(1,66) = 2.41$; $p=0.12$], but there was a significant effect of treatment [$F(1,66) = 47.05$; $p \leq 0.0001$] and an interaction between these two factors [$F(1,66) = 9.95$; $p \leq 0.002$]. Post hoc test showed that Obx group increased the immobility frequency compared to control and ObxFO groups ($p \leq 0.01$). FO supplementation reduced the frequency of this behavior compared to the non-supplemented groups (Fig. 3A).

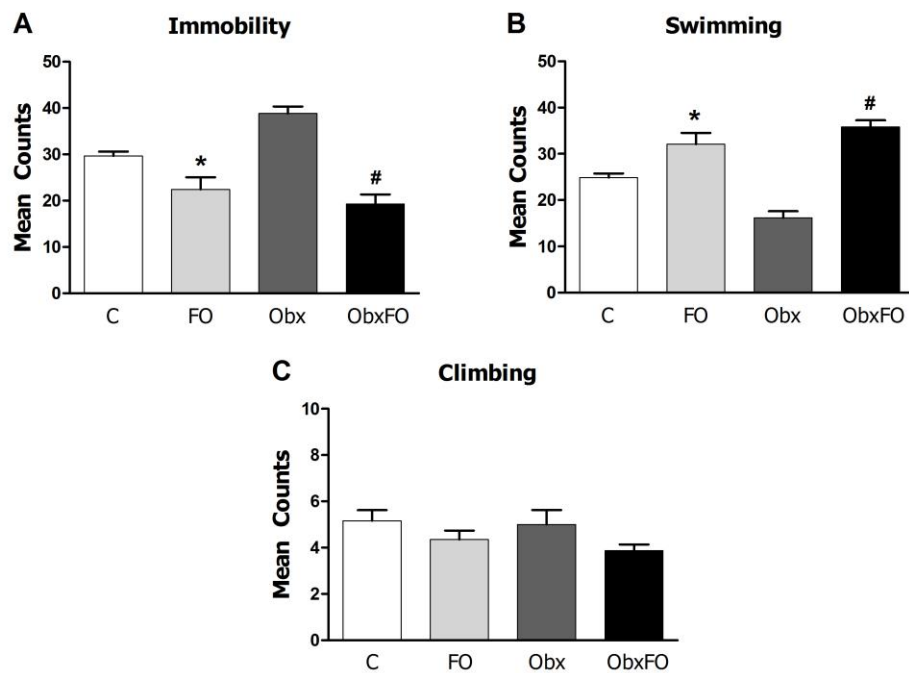


Figura 6 - Results of Modified Forced Swim Test. (A) Immobility, (B) Swimming and (C) Climbing. Control (C) $n = 20$; Fish Oil (FO) $n = 20$; Bulbectomized (Obx) $n = 15$; Bulbectomized Fish Oil (ObxFO) $n = 15$; Two-way ANOVA followed by Duncan's post hoc test. Values are expressed as mean \pm S.E.M. (A) * $p < 0.01$ comparing FO with C group. # $p < 0.0001$ comparing ObxFO with Obx and C groups; (B) * $p < 0.006$ comparing FO with C group. # $p < 0.0001$ comparing ObxFO with Obx and C groups.

As for swimming (Fig. 3B), there was no effect of olfactory bulbectomy [$F(1,66) = 1.90$; $p = 0.17$]. A main effect of treatment [$F(1,66) = 56.97$; $p \leq 0.0001$] as well as the interaction between treatment and condition [$F(1,66) = 12.19$; $p \leq 0.001$] was detected. Post hoc test showed that Obx rats swam less than the other groups ($p \leq 0.001$) and that FO increased the frequency of this behavior compared to the non-supplemented groups ($p \leq 0.001$). There were no effects of treatment, bulbectomy or interaction between factors on climbing behavior [$F(1,66) = 3.49$; $p = 0.07$; $F(1,66) = 0.17$; $p = 0.68$; $F(1,66) = 0.006$; $p = 0.94$], respectively.

3.1.3 Elevated Plus Maze Test

The results of the elevated plus maze are depicted in figure 4. Main effects of treatment [$F(1,66) = 16.27$; $p \leq 0.0001$], condition [$F(1,66) = 7.51$; $p \leq 0.007$] and interaction between these factors [$F(1,66) = 4.36$; $p \leq 0.04$] were detected in the

percentage of time spent into open arms (Fig. 4A), as well as in the percentage of time spent into closed arms [$F(1,66) = 35.57$; $p \leq 0.0001$], [$F(1,66) = 21.52$; $p \leq 0.0002$] and [$F(1,66) = 14.78$; $p \leq 0.0002$], respectively (Fig. 4B). Post hoc comparisons showed that Obx group exhibited more anxiety-like behaviors than C and ObxFO groups, spending less time in the open arms ($p \leq 0.001$) and more in the closed arms ($p \leq 0.0001$).

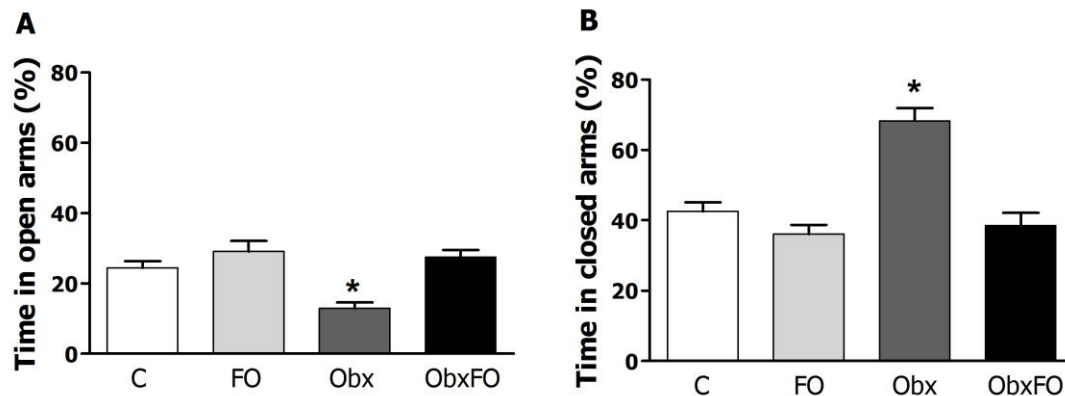


Figure 7 - Results of Elevated Plus Maze Test. (A) Time in open arms; (B) Time in closed arms. Control (C) $n = 20$; Fish Oil (FO) $n = 20$; Bulbectomized (Obx) $n = 15$; Bulbectomized Fish Oil (ObxFO) $n = 15$; Two-way ANOVA followed by Duncan's post hoc test. Values are expressed as mean \pm S.E.M. (A) * $p < 0.001$ comparing Obx with C and ObxFO groups; (B) * $p < 0.0001$ comparing Obx with C and ObxFO groups.

3.1.4 Object Location Test

Analysis of exploration time (Fig. 5A) showed a main effect of condition [$F(1,136) = 16.99$; $p \leq 0.0001$], but there was no effect of treatment [$F(1,136) = 1.64$; $p = 0.20$] or interaction between the factors [$F(1,136) = 0.01$; $p = 0.91$]. Post hoc comparisons showed that C ($p \leq 0.001$), FO ($p \leq 0.02$) and ObxFO groups ($p \leq 0.02$) spent more time exploring the object in the new than in the old position. Obx group showed no differences in exploration between the two positions ($p = 0.10$).

In regard to frequency of exploration (Fig. 5B), there was a main effect of condition [$F(1,136) = 7.37$; $p \leq 0.007$] and an interaction between condition and treatment [$F(1,136) = 6.34$; $p \leq 0.01$], but no effect of treatment [$F(1,136) = 0.026$; $p = 0.87$]. Post hoc analysis indicated that C ($p \leq 0.001$) and FO groups ($p \leq 0.02$) presented higher of exploring frequency of the object in the new than in the old position. Obx groups explored the objects located in new and old positions in a

similar way. Considering only the exploration frequency in the object placed in the new position, the Obx group exhibited a lower exploration frequency than the ObxFO group ($p \leq 0.002$).

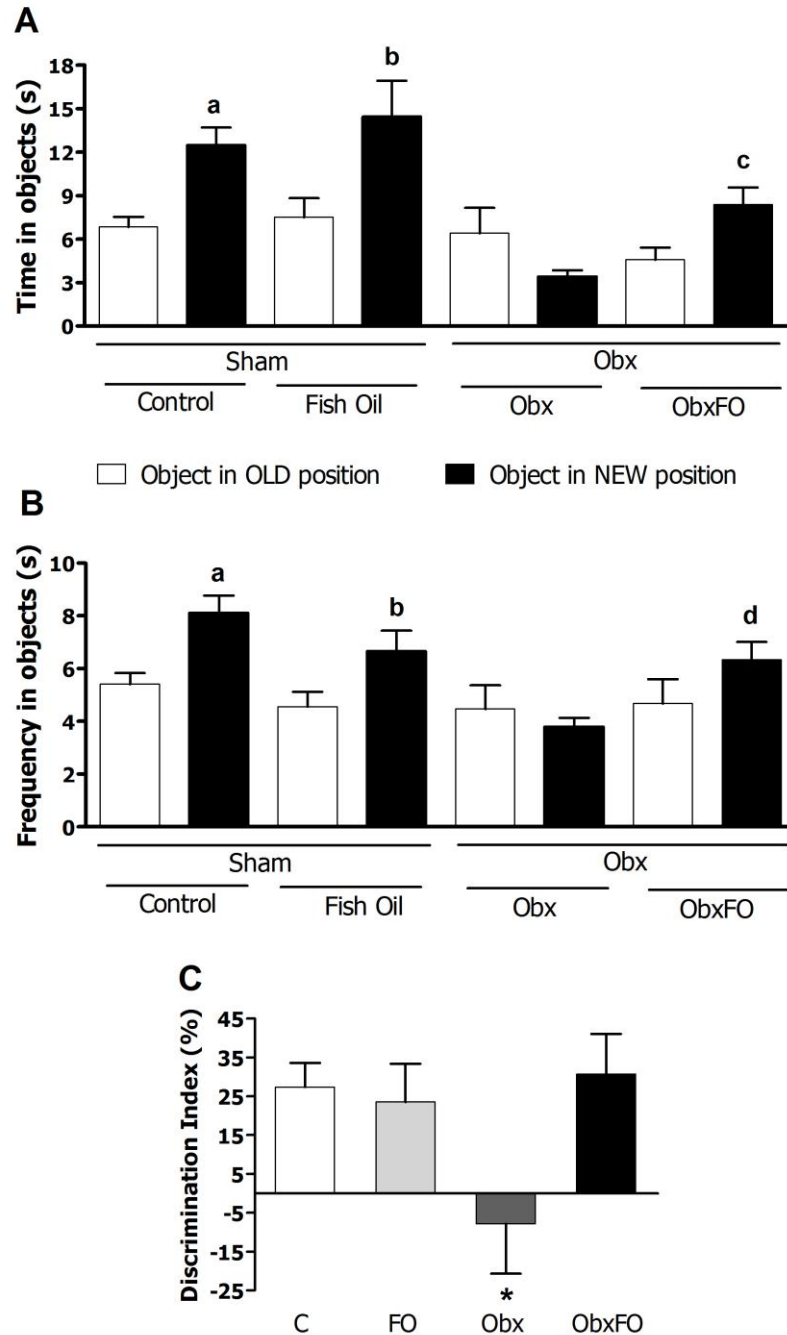


Figure 8 - - Object Location Test. (A) time in objects, (B) Frequency in objects and (C) Discrimination Index. Control (C) $n = 20$; Fish Oil (FO) $n = 20$; Bulbectomized (Obx) $n = 15$; Bulbectomized Fish Oil (ObxFO) $n = 15$; Two-way ANOVA followed by Student's t test. Values are expressed as mean \pm S.E.M. (A) Comparing New Position versus Old Position for C group ($^a p < 0.001$), FO Group ($^b p < 0.02$) and ObxFO group ($^c p < 0.02$). (B) Comparing exploration frequency in the New Position versus Old Position for C group ($^a p < 0.02$) and FO group ($^b p < 0.04$). Comparing ObxFO group in new position versus Obx group in new position ($^d p < 0.002$) (C) comparing Obx with C group ($* p < 0.01$) and with ObxFO group ($* p < 0.03$).

Regarding the discrimination index (Fig. 5C), there was no effect of treatment [$F(1,66) = 3.14$; $p=0.08$] or condition [$F(1,66) = 2.04$; $p=0.15$], but there was an effect of the interaction between these factors [$F(1,66) = 4.69$; $p\leq 0.03$]. Post hoc analysis revealed a significant difference of the Obx group compared to C and ObxFO groups ($p\leq 0.02$).

3.2.1 BDNF quantification

The BDNF results are depicted in figure 6. There was a treatment effect [$F(1,19) = 14.49$; $p\leq 0.001$], but no condition effect [$F(1,19) = 3.56$; $p=0.07$] or interaction [$F(1,19) = 0.30$; $p=0.59$]. Post hoc analysis showed an increase of this neurotrophin in FO group compared to C group ($p\leq 0.02$). Also in the ObxFO group the BDNF level is increased compared to Obx group ($p\leq 0.03$).

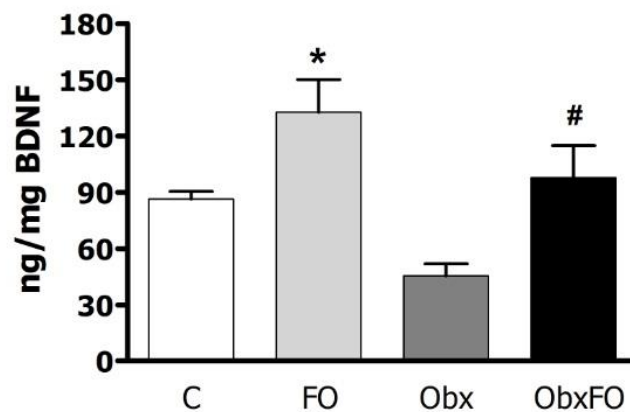


Figura 9 - BDNF quantification. Measurement of BDNF concentration (ng/mg) in the hippocampus. Control (C) $n = 6$; Fish Oil (FO) $n = 6$; Bulbectomized (Obx) $n = 5$; Bulbectomized Fish Oil (ObxFO) $n = 6$; Two-way ANOVA followed by Student's t test. Values are expressed as mean \pm S.E.M. * $p<0.02$ comparing with Control group; # $p<0.03$ comparing with Obx group.

3.2.2 Neurochemical data

Figures 7 A and C show hippocampal levels and figures 7 B and D show the turnover ratio of serotonin and dopamine of adult animals. Two-way ANOVA revealed main effects of treatment [$F(1,33) = 13.83$; $p\leq 0.001$] and condition [$F(1,33) = 12.77$; $p=0\leq 0.001$] but no interaction [$F(1,33) = 1.54$; $p=0.86$] on 5-HT hippocampal content. Student's t test showed that FO group increased 5-HT (53.2%; $p<0.02$) when

compared to Control group, while Obx group presented significant lower levels of this neurotransmitter when compared to Control group (56.35%; $p < 0.01$). The ObxFO group increased serotonin levels compared to Obx group (42.7%; $p < 0.003$) preventing this monoamine decrease.

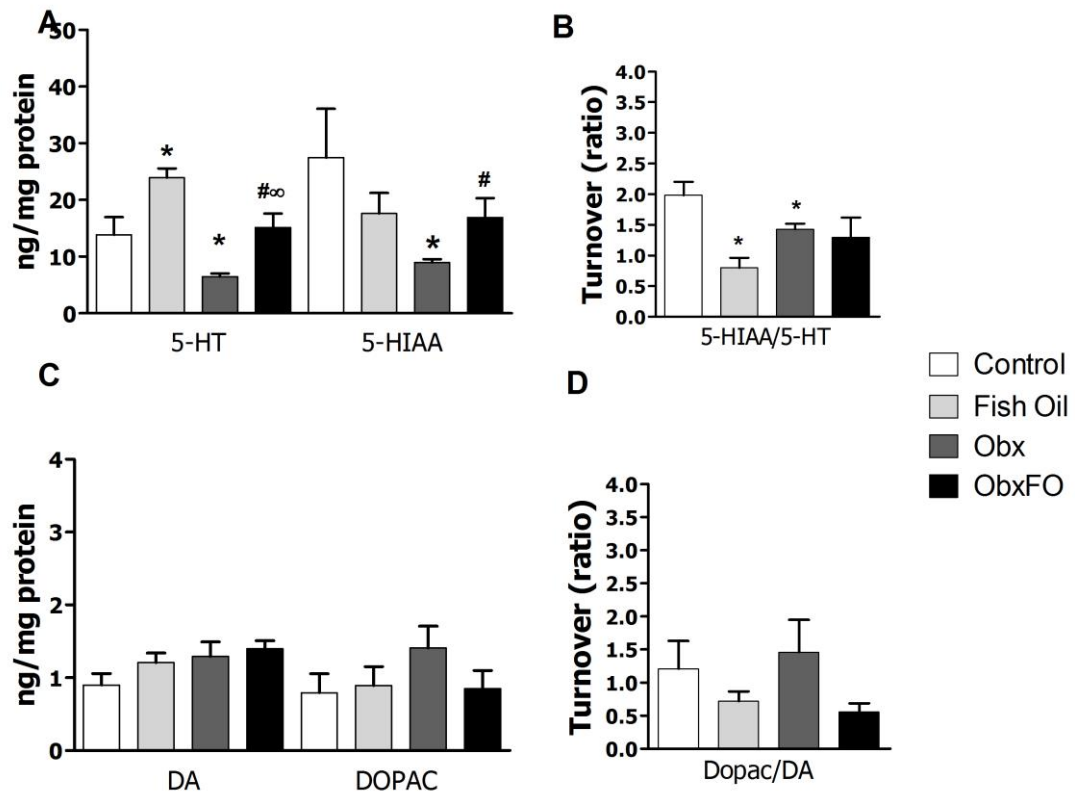


Figura 10 - Hippocampal neurochemical data. (A) 5-HT and 5-HIAA; (B) respective turnover ratio; (C) DA and DOPAC; (D) respective turnover ratio. Control (C) $n = 9$; Fish Oil (FO) $n = 9$; Bulbectomized (Obx) $n = 10$; Bulbectomized Fish Oil (ObxFO) $n = 10$; Two-way ANOVA followed by Student's t test. Values are expressed as mean \pm S.E.M. **(A)** * $p \leq 0.02$ comparing with Control group; [#] $p \leq 0.03$ comparing with Obx group; $\infty p \leq 0.01$ comparing with FO group. **(B)** * $p < 0.03$ comparing with Control group.

A main effect of condition [$F(1,33) = 4.4$; $p \leq 0.04$] but not of treatment [$F(1,33) = 2.44$; $p = 0.12$] or interaction [$F(1,33) = 0.77$; $p = 0.38$] was detected in DA content. After Student's t test, no differences were observed. The DOPAC levels were not affected by fish oil supplementation [$F(1,33) = 0.72$; $p = 0.40$], Obx [$F(1,33) = 1.15$; $p = 0.29$] or interaction [$F(1,33) = 1.50$; $p = 0.23$].

However, 5-HIAA concentrations were influenced by Obx [$F(1,33) = 6.13$; $p \leq 0.01$] and interaction [$F(1,33) = 5.44$; $p \leq 0.02$], but not by fish oil supplementation [$F(1,33) = 0.46$; $p = 0.50$]. After Student's t test, Obx group presented decreased levels

($p < 0.02$) when compared to Control group. Nevertheless, the ObxFO presented higher levels of this monoamine metabolite ($p < 0.03$) compared to Obx group.

Considering 5-HT turnover, the two-way ANOVA showed effect of fish oil supplementation [$F(1,33) = 8.94$; $p \leq 0.005$] and interaction [$F(1,33) = 5.78$; $p \leq 0.02$], but no effect of OBX [$F(1,33) = 0.01$; $p = 0.90$]. After post hoc Student's *t* test, data showed that both FO and Obx groups showed smaller turnover ratios compared to Control group ($p < 0.001$ and $p < 0.03$), respectively.

Analyzing DA turnover, the results pointed out a fish oil effect [$F(1,33) = 5.56$; $p \leq 0.02$] but no Obx [$F(1,33) = 0.04$; $p = 0.85$] or interaction [$F(1,33) = 0.07$; $p = 0.79$] effect. Student's *t* test showed no significant differences.

3.2.3 Lipid Profile

The lipid profile evaluation of hippocampus membranes of 21 day-old animals are depicted in Table 1, and the evaluation of adult animals in Table 2. In the 21 day-old animals, Student's *t* test showed that no effect of fish oil supplementation was observed regarding EPA ($t = 1.222$, $df = 8$, $p = 0.29$), but concerning DHA that effect was observed ($t = 2.928$, $df = 8$, $p < 0.02$).

Table 1 – Lipid Profile of hippocampal membranes of 21 day-old animals.

Fatty Acids	HIPOCCAMPUS	
	Control n=5	Fish Oil n=5
Myristic (14:0)	0.48 ± 0.09	0.31 ± 0.014
Palmitic (16:0)	26.22 ± 2.71	23.61 ± 0.14
7-hexadecenoic (16:1n-9)	0.26 ± 0.05	0.26 ± 0.02
Margaric (17:0)	1.78 ± 0.25	2.14 ± 0.03
Estearic (18:0)	24.39 ± 3.91	20.35 ± 0.15
Oleic (18:1n-9)	11.53 ± 1.70	13.11 ± 0.22
Vacenic (18:1n-7)	2.52 ± 0.46	2.94 ± 0.05
Linoleic (18:2n-6)	1.78 ± 0.61	0.97 ± 0.03
Eicosanoic (20:0)	0.43 ± 0.13	0.15 ± 0.03
Aracdonic (20:4n-6)	12.92 ± 1.95	14.92 ± 0.31
EPA (20:5n-3)	0.62 ± 0.5	0.07 ± 0.01
DHA (22:6n-3)	11.71 ± 1.92	17.5 ± 0.32 ^b

VALUES ARE EXPRESSED AS MEAN ± SEM. Student *t* TEST. ^a: DIFFERENT FROM CONTROL GROUP ($p < 0.001$); ^b: DIFFERENT FROM CONTROL GROUP ($p < 0.02$).

Table 2 – Lipid Profile of hippocampal membranes of adult animals.

Fatty Acids	HIPOCCAMPUS			
	Control n=6	Fish Oil n=6	Obx n=6	ObxFO n=6
Pentadecaenoic (15:0)	2.44±0.05	2.55±0.10	2.43±0.13	2.45±0.06
Palmitic (15:0)	25.05±0.17	24.68±0.14	25.23±0.26 ^a	25.42±0.05 ^a
7-hexadecenoic (16:1n-9)	3.93±0.09	3.96±0.10	3.84±0.19	3.98±0.05
Palmitoleic (16:1n-7)	1.13±0.05	1.23±0.09	1.14±0.04	1.20±0.06
8-heptadecenoic (17:1n-9)	0.88±0.03	0.94±0.05	0.91±0.04	0.94±0.04
Stearic (18:0)	24.07±0.19	24.48±0.31	24.37±0.17	24.03±0.29
Oleic (18:1n-9)	19.34±0.26	19.11±0.28	19.85±0.45	18.78±0.34
Vaccenic (18:1n-7)	3.32±0.07	3.50±0.05 ^b	3.15±0.11	3.46±0.08 ^b
Linoleic (18:2n-6)	14.55±0.16	14.32±0.36	13.97±0.21	14.43±0.25
Arachidonic (20:4n-6)	3.58±0.15	3.60±0.19	3.42±0.17	3.56±0.13
EPA (20:5n-3)	0.93±0.08	0.84±0.09	0.9±0.11	0.95±0.11
DHA (22:6n-3)	0.78±0.01	0.78±0.01	0.78±0.01	0.78±0.01

VALUES ARE EXPRESSED AS MEAN ± SEM. TWO-WAY ANOVA FOLLOWED BY DUNCAN'S POST HOC TEST. ^a: DIFFERENT FROM FISH OIL GROUP (p<0.04). ^b: DIFFERENT FROM OBX GROUP (p<0.01).

The results of adult animals showed that there was no influence of fish oil supplementation [F(1,19) = 0.04; p=0.83], Obx [F(1,19) = 0.13; p=0.72] or interaction [F(1,19) = 0.53; p=0.47] regarding EPA. Exactly the same occurred when DHA was analyzed, with no effect of fish oil [F(1,19) = 0.1; p=0.73], Obx [F(1,19) = 0.0; p=1.0] or even interaction [F(1,19) = 0.1; p=0.73].

4. Discussion

The present study examined the impact of fish oil supplementation during pre- and postnatal brain developmental periods in attenuating or even preventing the occurrence of depressive- and anxiety-like behaviors and cognitive dysfunctions in rats subjected to Obx depression model.

Previous studies have shown that olfactory bulbectomy induces hyperactivity in the open-field test (Cryan, Markou et al. 2002; Harkin 2003; Song and Leonard 2005; Zueger, Urani et al. 2005; Breuer, Groenink et al. 2007; Kelly, Wrynn et al. 2007; Wang, Qi et al. 2010) and increased anxiety-like behavior (Harkin 2003; Song and Leonard 2005; Wang, Noda et al. 2007), being this last alteration reversed by anxiolytic drugs (Wieronska and Papp 2001). In the present study, we observed that Obx induced hyperactivity and was anxiogenic, since the Obx group spent less time

in the open arms and more time in the closed arms of the EPM. Besides that, in the OF test the Obx group walked a greater distance in the peripheric zone than the center zone of the apparatus. All these data corroborating the abovementioned studies.

Interestingly, there was no effect of fish oil *per se* on hyperactivity or anxiety-like behavior. The supplementation rather prevented the motor alterations induced by Obx, as ObxFO group no longer differed from C and FO groups. These results are in agreement with previous studies from our group, using supplementation during pregnancy and lactation or post-weaning phases (Naliwaiko, Araujo et al. 2004; Ferraz, Kiss et al. 2008; Ferraz, Delattre et al. 2011; Vines, Delattre et al. 2012).

Concerning the MFST, the results showed that fish oil had an antidepressant effect even in sham-operated rats, since supplemented offspring displayed less depressive-like behaviors, reflected by decreased immobility and increased swimming frequencies. Bulbectomized rats, on the other hand, exhibited the expected depressive-like behavior, which was prevented by the FO supplementation.

The antidepressant effect of fish oil has been attributed to its hippocampal BDNF and 5-HT content increasing properties (Venna, Deplanque et al. 2009; Vines, Delattre et al. 2012). In fact, the neurochemical data showed that hippocampal levels of 5-HT and 5-HIAA, but not of DA, DOPAC, nor 5-HT- or DA turnovers, were decreased by OBX. The reduction in 5-HT levels in Obx rats is in line with previous studies (Jancsar and Leonard 1984; Redmont, Kelly et al. 1997; van der Stelt, Breuer et al. 2005; Moriguchi, Han et al. 2006; Song and Wang 2010). The lack of Obx effect on DA hippocampal content as reported by Van der Stelt et al., 2005 corroborates our findings. Importantly, fish oil supplementation in Obx rats maintained hippocampal 5-HT levels elevated, since they were indistinguishable from sham-operated supplemented rats. In a previous work (Vines et al., 2012) it was shown that the antidepressant effect of fish oil supplementation was due to an increased 5-HT neurotransmission, because administration of WAY 100135, a 5-HT_{1A} receptor antagonist, blocked the effect of fish oil in the modified forced swim test. Evidence that this may indeed be the case in our results comes from findings of reversal of Obx-induced serotonergic deficiency by chronic treatment with antidepressants (Harkin 2003).

Decreased levels of neurotrophic factors, most notably BDNF, are usually found in depressed patients, which is in agreement with the molecular hypothesis of

depression (Duman, Heninger et al. 1997; Karege, Perret et al. 2002; Karege, Bondolfi et al. 2005; Piccinni, Marazziti et al. 2008; Wang, Dranovsky et al. 2008; Kurita, Nishino et al. 2012; Oral, Canpolat et al. 2012). Moreover, BDNF levels in the hippocampus and prefrontal cortex are significantly reduced in suicide victims compared with non-suicide controls supporting this hypothesis (Karege, Vaudan et al. 2005). Reduced hippocampal levels of BDNF in Obx animals adds further evidence to BDNF deficit hypothesis of depression and corroborates the results of a recent study by Hendriksen and co-workers (Hendriksen, Meulendijks et al. 2012) showing a significant reduction of 15% in the hippocampal BDNF levels in Obx rats. Corroborating these studies our data showed decreased levels of this neurotrophin in Obx group, but when the animals were previously supplemented this Obx effect was not seen. Interestingly, fish oil supplementation alone increased BDNF levels, replicating previous findings from our group (Vines, Delattre et al. 2012).

The link between 5-HT and BDNF expression or function has been established, as BDNF promotes the development, survival and plasticity of serotonergic neurons during hippocampal development and adulthood, and this may be related to its role in depression (Yu and Chen 2011). Considering the present results, we suggest that fish oil supplementation induced, primarily, the increase of hippocampal BDNF expression, which mediates cell survival, growth and plasticity (Martinowich and Lu 2008). Elevated levels of BDNF, in turn, would increase 5-HT content, whilst reducing hippocampal 5-HIAA, as seen in the fish oil-supplemented group, probably by preventing the degradation of 5-HT in neurons of this area. In other hand, serotonin acts on 5-HT_{1A} autoreceptors, causing up-regulation of BDNF, via activation of trkB (a tyrosine-related kinase B receptor, that activates several others neurotrophins) promoting serotonergic phenotype-specific markers (Galter and Unsicker 2000).

By using the object location task we showed memory impairment in the Obx rats, indicating that Obx model caused spatial memory impairment, which requires hippocampal integrity (Song and Leonard 2005; Ostrovskaya, Gruden et al. 2007). Despite the known cognition enhancer effect of ω -3 PUFA (Asl, Sheikhzade et al. 2008; Gomez-Pinilla 2008; Wu, Yinga et al. 2008; Song, Zhang et al. 2009; Venna, Deplanque et al. 2009; Su 2010; Ferraz, Delattre et al. 2011), there was no remarkable changes in sham-operated rats, however, we observed a maintenance of the cognitive function in the ObxFO group. The negative discrimination index

exhibited by Obx rats supports the idea that fish oil prevented the impairing effects of Obx on spatial memory.

A recent report by Song and co-workers (Song, Zhang et al. 2009) showed that 7 weeks of EPA administration to Obx animals was efficient in improving memory in the water maze test. According to the authors EPA, may improve depression and memory impairment *via* its anti-inflammatory effect, by reducing prostaglandin E2 (PGE2) and interleukin-1 β (IL-1 β) levels, and its neuroprotective mechanisms, including augmented levels of nerve grow factor (NGF) and normalization of neurotransmitters levels. In our study the animals were supplemented with 3.0 g/kg of fish oil containing 12% of EPA and 18% of DHA for approximately 2 months, thus we attribute the beneficial effects to both ω -3 PUFAs. Importantly, DHA is the ω -3 fatty acid most inserted in neuronal membranes and has been shown to possess a potential effect in increasing BDNF expression in hippocampus (Gomez-Pinilla 2008; Venna, Deplanque et al. 2009).

Through lipid analysis of neuronal membranes, we have showed in this study that chronic fish oil supplementation (rich in DHA and EPA) ingestion during pregnancy and lactation periods was able to alter lipid concentration in the hippocampus of 21 day-old animals increasing DHA concentration in this structure. Nevertheless, the hippocampal lipid analysis in 102 days-old animals submitted to the same supplementation protocol did not revealed significant differences related to DHA or EPA contents among the experimental groups.

As the animals were maintained without supplementation for a long period (from the end of lactation up to 102 days), we believe that the DHA incorporated to membranes was degraded. Interestingly, the supplementation with FO during this important phase of central nervous system development was able in preventing the behavioral deficits induced by OBX model in adult rats. These data are in agreement with our recent study that reported a decreased behavioral despair in the MFST of the adult offspring which were supplemented using the same protocol, suggesting a long-term antidepressant effect of fish oil (Vines et al., 2012).

Taken together, the current results suggest that fish oil supplementation during pre- and postnatal brain developmental periods attenuated and even prevented anxiety-, depressive-like behaviors and cognitive dysfunctions in rats subjected to Obx depression model. These results may be explained by increased levels of BDNF and 5-HT in the hippocampus. Considering the key role of BDNF in promoting

neuronal survival and enhanced long-term plasticity in the hippocampus, the present study demonstrated that increased hippocampal BDNF expression counteracted the behavioral effects of Obx.

5. Conclusion

The present findings confirm the antidepressant effects of ω -3 PUFA supplementation, likely related to increased hippocampal serotonergic neurotransmission. As suggested in a previous study, fish oil seems to mediate a reciprocal involvement of activated serotonergic system and increased hippocampal BDNF expression, which, in turn, appears to counteract the memory deficits induced by the Obx model.

Acknowledgments

This study was supported by grants from CNPq (Casadinho/PROCAD Grant No: 552226/2011-4). The authors are indebted to Laboratório Herbarium Botânico S/A, which kindly donated the fish oil capsules rich in DHA and EPA. Deborah Suchecki DS is the recipient of a research fellowship from CNPq. Anete Curte Ferraz and Marcelo Meira Santos Lima are the recipients of Fundação Araucária - Governo do Estado do Paraná fellowship.

5 DISCUSSÃO

Esse estudo examinou o impacto da suplementação com óleo de peixe durante fases pré e pós-natais de desenvolvimento encefálico em atenuar ou mesmo prevenir a ocorrência de comportamento depressivo, ansiedade e disfunções cognitivas em ratos submetidos ao modelo de depressão da bulbectomia olfatória (OBX).

Os resultados do campo aberto mostram, como esperado, que o grupo bulbectomizado apresentou aumento nos parâmetros: distância na periferia, tempo na periferia, distância total e velocidade. Esse fato é amplamente conhecido (BREUER *et al.*, 2007; CRYAN; MARKOU; LUCKI, 2002; KELLY *et al.*, 2007; SONG; LEONARD, 2005; WANG *et al.*, 2010; ZUEGER *et al.*, 2005) e a presença desse comportamento garante uma cirurgia bem sucedida. É importante ressaltar que a hiperatividade observada nesse modelo de depressão não é devido à anosmia, e sim às lesões retrógradas em todas as áreas com as quais os bulbos olfatórios têm ligação, devido ao rompimento das conexões neurais. Esse fato foi comprovado através da indução de anosmia por sulfato de zinco, o qual foi borrifado na cavidade nasal de ratos, e estes não apresentaram as alterações típicas do modelo da bulbectomia (SONG; LEONARD, 2005).

Além da hiperatividade, aumento na ansiedade é observado nos animais bulbectomizados (HARKIN; KELLY, LEONARD, 2003; SONG; LEONARD, 2005; WANG *et al.*, 2007). Em nosso estudo, durante o labirinto em cruz elevado, os animais do grupo Obx permaneceram aproximadamente 68% do tempo de teste nos braços fechados, enquanto nos animais dos demais grupos essa porcentagem foi, em média, 40%. Esse comportamento ansioso também corrobora o efeito da cirurgia, ao passo que o fato de o grupo ObxFO ter apresentado valores semelhantes aos controles mostra que o óleo de peixe diminuiu a ansiedade desses animais. Essa melhora também foi encontrada por Wieronska e Papp (2001) que, através de medicamentos ansiolíticos, observaram diminuição do tempo de permanência nos braços fechados em animais bulbectomizados.

Com respeito à suplementação, não houve efeito do óleo de peixe *per se* tanto promoção de efeitos motores no campo aberto, como de efeitos ansiolíticos no

labirinto em cruz elevado. Esses dados corroboram estudos prévios de nosso laboratório, que utilizaram tanto suplementação na mesma janela temporal utilizada nesse estudo, quanto durante todo o período de vida (NALIWAICO *et al.*, 2004; FERRAZ *et al.*, 2008; FERRAZ *et al.*, 2011; VINES *et al.*, 2012).

Por outro lado, o óleo de peixe foi capaz de prevenir os sintomas induzidos pela OBX nesses dois testes, demonstrado pelos resultados do grupo ObxFO, que tiveram valores semelhantes aos grupos Controle (C) e Óleo de peixe (FO).

Quanto ao teste de Natação Forçada Modificado, os resultados obtidos demonstraram que a prole das fêmeas submetidas à suplementação apresentou menos comportamento depressivo, refletido pelas frequências diminuídas de imobilidade e aumentadas de natação. O grupo Obx apresentou aumento da imobilidade, como esperando, sendo que este comportamento foi revertido pela suplementação com óleo de peixe no grupo ObxFO, que apresentou níveis semelhantes ao grupo suplementado (FO). Esse papel antidepressivo do óleo de peixe vem sendo atribuído aos seus efeitos em aumentar os níveis tanto de BDNF quanto de serotonina no hipocampo de ratos adultos (VENNA *et al.*, 2009; VINES *et al.*, 2012). Portanto, decidimos investigar o efeito do óleo de peixe em restaurar possíveis alterações neuroquímicas induzidas pelo modelo de depressão da bulbectomia olfatória.

Nossos dados neuroquímicos apontam diminuição de serotonina e seu metabólito (5-HIAA) após a bulbectomia, porém não de dopamina, seu metabólito (DOPAC) ou mesmo nos taxa de renovação de serotonina ou dopamina. O decréscimo de serotonina após a bulbectomia encontrado em nosso estudo está de acordo com outros autores, que também encontraram níveis diminuídos dessa monoamina (JANCSAR; LEONARD, 1984; SONG; WANG, 2010; REDMONT *et al.*, 1997; MORIGUCHI *et al.*, 2006; VAN DER STELT *et al.*, 2005).

Com relação à dopamina, foi estudado por Sato e colaboradores (2010) alterações no comportamento maternal após realização da bulbectomia, tendo seus resultados mostrado que alterações ocorridas no sistema dopaminérgico como um todo contribuíram para as modificações comportamentais encontradas nas fêmeas em questão. Ainda, Song and Wang (2010) encontraram diminuição nos níveis de dopamina, dados estes que não fomos capazes de reproduzir. Uma possível explicação para os diferentes resultados encontrados após a bulbectomia pode estar relacionada aos distintos ensaios metodológicos ou às diferentes áreas cerebrais

abordadas. Como a bulbectomia provoca alterações em uma gama muito grande de regiões, diferentes áreas podem ser abordadas em cada estudo, sendo mais comuns o hipocampo e córtex pré-frontal, mas também foram analisados amígdala, estriado, hipotálamo, giro denteado, substância negra, etc. Em dois estudos autoradiográficos (SATO *et al.*, 2008; SATO; SKELIN; DIKSIC, 2010) foram acessadas áreas bem específicas tanto do sistema límbico quanto do córtex e núcleos da rafe, porém numa investigação de receptores serotoninérgicos. Como as tarefas de memória espacial estão intimamente relacionadas com hipocampo e hipotálamo (SHU *et al.*, 2003), e um teste de memória espacial também foi realizado em nosso experimento, nosso alvo de análise foi o hipocampo. Após a suplementação com óleo de peixe, os níveis hipocampais de serotonina se mostraram aumentados, seu metabólico diminuiu, assim como também diminuiu sua taxa de renovação, porém sem afetar a neurotransmissão dopaminérgica.

Este efeito antidepressivo, devido principalmente ao sistema serotoninérgico na prole adulta suplementada, indica uma influência duradoura do óleo de peixe, que corroborou estudo anterior de nosso laboratório (VINES *et al.*, 2012). Assim, o óleo de peixe foi capaz de prevenir os déficits na neurotransmissão serotoninérgica. Uma vez que o tratamento crônico com drogas antidepressivas reverte os déficits induzidos pelo modelo da bulbectomia olfatória (HARKIN; KELLY; LEONARD, 2003), podemos especular que o óleo de peixe exibe um efeito antidepressivo, normalizando alterações neuroquímicas que se assemelham às deficiências encontradas em humanos com depressão.

Níveis diminuídos de neurotrofinas foram amplamente observados em pacientes deprimidos, especialmente de BDNF, o que está de acordo com a hipótese das neurotrofinas e ajuda a explicar a patogênese da depressão (KURITA *et al.*, 2012; ORAL *et al.*, 2012; PICCINNI *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2008; KAREGE *et al.*, 2005a; KAREGE *et al.*, 2002; DUMAN *et al.*, 1997). Ainda, níveis diminuídos de BDNF no hipocampo e córtex pré-frontal estão significativamente reduzidos em vítimas de suicídio comparados com pacientes não suicidas controles (KAREGE *et al.*, 2005b), além de níveis aumentados de BDNF terem sido encontrados em amostras cerebrais *postmortem* de pacientes tratados com antidepressivos quando comparados com pacientes deprimidos não-tratados (CHEN *et al.*, 2001), dando ainda mais suporte à hipótese das neurotrofinas. Em relação aos níveis de BDNF após a bulbectomia, as revisões trazem que ocorre diminuição (SONG; LEONARD,

2005; HARKIN; KALLY; LEONARD, 2003), sendo esses dados encontrados em estudo recente (HENDRIKSEN *et al.*, 2012), ao passo que outros estudos não foram capazes de repetir esses achados, com Van Hoomisen e colaboradores (2003) referindo níveis de BDNF inalterados após o processo cirúrgico. Já Luo e colaboradores (2010) encontraram níveis inalterados de BDNF em estruturas cerebrais, porém aumentado no soro. Ainda, há estudos verificando ocorrência de aumento de BDNF após a realização do procedimento cirúrgico (HELLWEG *et al.*, 2007; SOHRABJI; PEPPLES; MARROQUIN, 2000).

No presente estudo a diminuição dos níveis de BDNF encontrada no hipocampo dos animais bulbectomizados contribui em favor da hipótese das neurotrofinas e corrobora os resultados de um recente estudo realizado por Hendriksen e colaboradores (HENDRIKSEN *et al.*, 2012), que mostrou diminuição de 15% dos níveis de BDNF hipocampais em animais submetidos à OBX, que foram significativos estatisticamente. Fato de grande relevância foi a suplementação com óleo de peixe *per se* sendo capaz de aumentar os níveis de BDNF, confirmando dados anteriores de nosso laboratório (VINES *et al.*, 2012). O referido estudo mostrou que a suplementação durante a gestação e lactação, fez com que os níveis de BDNF tanto no córtex como no hipocampo, fossem aumentados. Fato ocorrido em animais de 21 dias, assim como nos de 90. Esse estudo também encontrou um efeito antidepressivo do óleo de peixe, o qual está possivelmente relacionado à indução de expressão do BDNF e aumento na transmissão serotoninérgica no hipocampo e córtex pré-frontal. No atual estudo, a suplementação foi eficaz em prevenir o déficit de BDNF, pois os animais bulbectomizados suplementados com óleo de peixe alcançaram os níveis do controle.

A ligação entre serotonina e expressão ou atuação do BDNF já é bem estabelecida, mostrando que o BDNF promove o desenvolvimento, sobrevivência e plasticidade em neurônios serotoninérgicos durante o desenvolvimento hipocampal, assim como na vida adulta, e pode estar relacionado ao seu papel na depressão (YU; CHEN, *et al.*, 2011). Considerando os presentes resultados, sugerimos que a suplementação com óleo de peixe resultou, primariamente, em aumento hipocampal da expressão de BDNF, o que medeia tanto sobrevivência quanto crescimento e plasticidade celulares (MARTINOWICK; LU, 2008). Essa idéia confirma a associação entre aumento de serotonina e diminuição de seu metabólito no hipocampo de animais suplementados, provavelmente prevenindo a degradação de 5-HT em

neurônios dessa área. Fatos esses que corroboram o efeito antidepressivo do óleo de peixe encontrado por Vines e colaboradores (VINES *et al.*, 2012). Levando em conta a recuperação estabelecida pelo óleo de peixe rico em ácidos graxos poliinsaturados nos déficits de BDNF e serotonina nos animais bulbectomizados, esses dados suportam a ocorrência de efeito antidepressivo nesse modelo de depressão. Também, em relação ao protocolo de suplementação, o aumento na expressão hipocampal de BDNF deve representar a ocorrência de um efeito antidepressivo resiliente induzido pelo óleo de peixe.

O modelo da bulbectomia olfatória causa déficits cognitivos e tem sido usada por muitos autores para estudo dos estágios iniciais da Doença de Alzheimer com componente depressivo (BORRE *et al.*, 2012; YAMADA *et al.*, 2011; BAHAR-FUCKS *et al.*, 2010). Em adição, animais bulbectomizados exibem déficits de memória dependente de hipocampo, diminuição de potenciação de longa duração e danos na densidade dendrítica (OSTROVSKAYA *et al.*, 2007; SONG; LEONARD, 2005; HARKIN; KELLY; LEONARD, 2003).

Nesse estudo, usando o teste de localização de objetos, foram investigados os efeitos da suplementação com óleo de peixe no déficit de memória espacial induzida pela OBX. Considerando o tempo de exploração, foi observado que houve diferença significativa para os grupos controle (C), óleo de peixe (FO) e bulbectomizado suplementado (ObxFO), comparando o tempo de exploração no objeto localizado na posição nova com o tempo de exploração no objeto deixado na posição antiga. Para o parâmetro frequência de exploração, os resultados foram similares, com os mesmos grupos sendo significativamente diferentes.

Em contraste, os animais bulbectomizados (Obx) não apresentaram aumento nem no tempo e nem na frequência exploratória comparando o novo posicionamento com o antigo. Essa falha em reconhecer a troca de localização de um mesmo objeto indica que a OBX causou prejuízo na memória espacial, identificada pelo teste utilizado. A memória espacial requer um sistema hipocampal íntegro, áreas que possivelmente tenham sido mais suscetíveis à neurodegeneração provocada pela bulbectomia. Devido ao conhecido efeito de potencialização cognitiva dos ácidos graxos poliinsaturados ω -3 (FERRAZ *et al.*, 2011; SU *et al.*, 2010; SONG; ZHANG; MANKU, 2009; VENNA *et al.*, 2009; WU *et al.*, 2008; GOMEZ-PINILLA *et al.*, 2008; ASL *et al.*, 2008; FEDOROVA *et al.*, 2007), o óleo de peixe, surpreendentemente, apresentou o mesmo desempenho do grupo controle no teste de localização de

objetos. Por outro lado, a suplementação foi capaz de atenuar os déficits de memória espacial induzidos pela bulbectomia, pois o grupo óleo de peixe bulbectomizado (ObxFO) apresentou aumento de 83% no tempo de exploração, e ainda aumento de 42% na frequência exploratória. Além de que, se compararmos apenas os dados obtidos em relação ao objeto na nova posição entre todos os grupos, há um grande déficit do grupo Obx em comparação ao FO e Controle. O grupo ObxFO teve valores significativamente maiores do que o bulbectomizado, apesar de não ter conseguido se equiparar aos controles.

O índice de discriminação mede a resposta dos animais em explorar novidade e familiaridade. Valores significativamente maiores que zero indicam animais explorando mais o objeto na posição nova do que na antiga. Já resultados abaixo de zero indicam mais exploração do objeto na posição familiar. Nossos resultados em relação a esse índice demonstraram o grupo Obx com valores negativos, evidenciando o déficit de memória desses animais, enquanto os demais grupos apresentaram valores positivos e iguais entre si. Portanto, os dados enfatizam o déficit de memória apresentado pelo grupo bulbectomizado, assim como mostram a melhora/manutenção da capacidade de memória.

Em um estudo de 2009, Song e colaboradores (SONG; ZHANG; MANKU, 2009) mostraram que suplementação com EPA, um ácido graxo poliinsaturado ω -3, durante 7 semanas à animais bulbectomizados melhorou a memória quando testados no Labirinto Aquático. De acordo com esses autores, EPA atua na depressão e aumenta a memória devido a efeitos antiinflamatórios (diminuição de expressão de prostaglandinas E2 (PGE2) e redução de interleucinas 1β (IL- 1β)) e mecanismos neuroprotetores (via *up regulation* de fator de crescimento neural e normalização de neurotransmissores). Ainda, esses autores mostraram que o EPA reduziu tanto a expressão de fosfolipase A2, quanto à concentração de PGE2 e IL- 1β e aumentou a expressão do fator de crescimento neural (NGF) no hipocampo, contribuindo para a normalização dos déficits de memória dos ratos submetidos à OBX.

No presente estudo, o protocolo de suplementação foi de 3.0g/kg de óleo de peixe, sendo cada cápsula composta por 12% de EPA e 18% de DHA, por aproximadamente 2 meses (acasalamento, gestação e lactação), assim atribuímos os benefícios vistos em nosso estudo a esses dois ácidos graxos da família ω -3. O DHA, ácido graxo mais abundante no sistema nervoso central, está inserido nas

membranas neuronais, tem mostrado eficiência em aumentar a expressão de BDNF no hipocampo (VENNA *et al.*, 2009; GOMEZ-PINILLA *et al.*, 2008). Embora o perfil lipídico das amostras não tenha revelado diferenças significativas de DHA ou EPA, acreditamos que isso seja devido ao longo período decorrido sem que esses animais recebessem suplementação. Como de acordo com a literatura deva ter ocorrido um aumento de EPA e DHA nas membranas neuronais durante a gestação e lactação, mas que por sua vez não foi visto, provavelmente tenha sofrido renovação e não seja mais perceptível, embora seus efeitos, de algum modo, ainda se manifestem.

Possivelmente a associação entre depressão e diminuição dos níveis de BDNF esteja baseada na disfunção hipocampal. BDNF é mais frequentemente encontrado no hipocampo, uma área cerebral que desenvolve um importante papel nos processos de memória e está associado à depressão. Assim, neurotrofinas como BDNF e NGF devem exercer um papel chave no prejuízo cognitivo que ocorre em pacientes deprimidos, restaurando as ligações neuronais envolvidas no aprendizado e memória.

De acordo com nossos resultados, suplementação com óleo de peixe durante as fases pré-concepção à lactação, ou seja, nos períodos mais críticos de desenvolvimento dos neurônios cerebrais, foi capaz de atenuar o aparecimento de sintomas depressivos, assim como disfunções cognitivas, em ratos submetidos à bulbectomia.

Em resumo, o presente estudo sugere que a suplementação promoveu aumento na expressão de BDNF e na transmissão serotoninérgica do hipocampo. Esses resultados do óleo de peixe resultam em um robusto efeito antidepressivo. Considerando o papel inquestionável do BDNF na promoção da sobrevivência neuronal, assim como aumento da potencialização de longa duração hipocampal, o presente estudo demonstrou que o aumento da expressão de BDNF no hipocampo neutralizou os déficits na memória espacial induzidos pela OBX. Estudos futuros são necessários para investigar os mecanismos pelos quais o óleo de peixe restaura todas as alterações comportamentais características desse modelo.

6 CONCLUSÃO

Esses dados, obtidos a partir de um modelo de depressão, confirmam os efeitos antidepressivos da suplementação com ácidos graxos ω -3, os quais estão relacionados com aumento na transmissão serotoninérgica do hipocampo. Como sugerido por estudo anterior, o óleo de peixe parece mediar um envolvimento recíproco de ativação do sistema serotoninérgico com aumento na expressão de BDNF no hipocampo, e esse aumento hipocampal de neurotrofinas parece combater os déficits de memória induzidos pela bulbectomia olfatória.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 2ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

ASL, N. A.;SHEIKHZADE, F.;TORCHI, M.;ROSHANGAR, L.;KHAMNEI, S. Long-term regular exercise promotes memory and learning in young but not in older rats. **Pathophysiology**, v.15, n.1, Jun, p.9-12. 2008.

BAHAR-FUCKS, A.;CHETELAR, G.;VILLEMAGNE, V. L.;MOSS, S.;PIKE, K.;MASTERS, Z. L.;ROWE, C.;SAVAGE, G. Olfactory deficits and amyloid-beta burden in Alzheimer's Disease mild cognitive impairment, and healthy-aging: a PiB PET study. **Journal of Alzheimer's Disease**, v.22, p.1081-1087. 2010.

BLIGH, E.G., DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can Biochemistry** v.37, p.911-917, 1959.

BOLDRINI, M.;UNDERWOOD, M. D.;HEN, R.;ROSOKLIJA, G. B.;DWORK, A. J.;JOHN MANN, J.;ARANGO, V. Antidepressants increase neural progenitor cells in the human hippocampus. **Neuropsychopharmacology**, v.34, n.11, Oct, p.2376-89. 2009.

BORRE, Y.;BOSMAN, E.;LEMSTRA, S.;WESTPHAL, K. G.;OLIVIER, B.;OOSTING, R. S. Memantine partly rescues behavioral and cognitive deficits in an animal model of neurodegeneration. **Neuropharmacology**, v.62, n.5-6, Apr, p.2010-7. 2012.

BORSONELO, E. C.;GALDUROZ, J. C. The role of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) in development, aging and substance abuse disorders: review and propositions. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v.78, n.4-5, Apr-May, p.237-45. 2008.

BOTHAM, K. M.; MAYES, P. A. Biossíntese dos ácidos graxos e eicosanóides. In: MURRAY, R. K.; GRANNER, D. K.; RODWELL, V. W. **Harper Bioquímica Ilustrada**. 27ed. São Paulo: McGraw-Hill, 2007.

BREUER, M. E.;GROENINK, L.;OOSTING, R. S.;WESTENBERG, H. G.;OLIVIER, B. Long-term behavioral changes after cessation of chronic antidepressant treatment in olfactory bulbectomized rats. **Biol Psychiatry**, v.61, n.8, Apr 15, p.990-5. 2007.

BROADHURST, P. L. The place of animal psychology in the development of psychosomatic research. **Fortschr Psychosom Med**, v.1, p.63-9. 1960.

BUCKLAND, M. E.;CUNNINGHAM, A. M. Alterations in the neurotrophic factors BDNF, GDNF and CNTF in the regenerating olfactory system. **Ann N Y Acad Sci**, v.855, Nov 30, p.260-5. 1998.

CAIRNCROSS, K. D.;COX, B.;FORSTER, C.;WREN, A. F. A new model for the detection of antidepressant drugs: Olfactory bulbectomy in the rat compared with existing models. **Journal of Pharmacological Methods**, v.1, n.2, p.131–143. 1978.

CALDER, P. C. Immunoregulatory and anti-inflammatory effects of n-3 polyunsaturated fatty acids. **Braz J Med Biol Res**, v.31, n.4, Apr, p.467-90. 1998.

CALDER, P. C. Long-chain n-3 fatty acids and inflammation: potential application in surgical and trauma patients. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.36, n.4, p.433-446, 2003.

CALON, F.;COLE, G. Neuroprotective action of omega-3 polyunsaturated fatty acids against neurodegenerative diseases: Evidence from animal studies. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v.77, n.5, p.287-293. 2007.

CANBEYLI, R. Sensorimotor modulation of mood and depression: an integrative review. **Behav Brain Res**, v.207, n.2, Mar 5, p.249-64. 2010.

CARLSON, G. A.;KASHANI, J. H. What is new in bipolar disorder and major depressive disorder in children and adolescents. **Child Adolesc Psychiatr Clin N Am**, v.11, n.3, Jul, p.xv-xxii. 2002.

CHALON, S.;VANCASSEL, S.;ZIMMER, L.;GUILLOTEAU, D.;DURAND, G. Polyunsaturated fatty acids and cerebral function: focus on monoaminergic neurotransmission. **Lipids**, v.36, n.9, Sep, p.937-44. 2001.

CHEN, B.;DOWLATSHAHI, D.;MACQUEEN, G. M.;WANG, J. F.;YOUNG, L. T. Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication. **Biol Psychiatry**, v.50, p.260 –265. 2001.

CHEN, Z. Y.;CUNNANE, S. C. Refeeding after fasting increases apparent oxidation of N-3 and N-6 fatty acids in pregnant rats. **Metabolism**, v.42, n.9, Sep, p.1206-11. 1993.

CHIU, C. C.;HUANG, S. Y.;SHEN, W. W.;SU, K. P. Omega-3 fatty acids for depression in pregnancy. **Am J Psychiatry**, v.160, n.2, Feb, p.385. 2003.

COLANGELO, L. A.;HE, K.;WHOOLEY, M. A.;DAVIGLUS, M. L.;LIU, K. Higher dietary intake of long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids is inversely associated with depressive symptoms in women. **Nutrition**, v.25, n.10, Oct, p.1011-9. 2009.

COOPER, G. M.; HAUSMAN, R. **A célula. Uma abordagem molecular**. 3ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.

CRYAN, J. F.;MARKOU, A.;LUCKI, I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Trends Pharmacol Sci**, v.23, n.5, May, p.238-45. 2002.

CRYAN, J. F., PAGE, M. E., LUCKI, I. Noradrenergic lesions differentially alter the antidepressant-like effects of reboxetine in a modified forced swim test. **Eur J Pharmacol** v.436, p.197-205, 2002b.

DA SILVA, T. M.;MUNHOZ, R. P.;ALVAREZ, C.;NALIWAICO, K.;KISS, A.;ANDREATINI, R.;FERRAZ, A. C. Depression in Parkinson's disease: a double-blind, randomized, placebo-controlled pilot study of omega-3 fatty-acid supplementation. **J Affect Disord**, v.111, n.2-3, Dec, p.351-9. 2008.

DE VRIESE, S. R.;CHRISTOPHE, A. B.;MAES, M. Lowered serum n-3 polyunsaturated fatty acid (PUFA) levels predict the occurrence of postpartum depression: further evidence that lowered n-PUFAs are related to major depression. **Life Sci**, v.73, n.25, Nov 7, p.3181-7. 2003.

DELATTRE, A. M.;KISS, A.;SZAWKA, R. E.;ANSELMO-FRANCI, J. A.;BAGATINI, P. B.;XAVIER, L. L.;RIGON, P.;ACHAVAL, M.;IAGHER, F.;DE DAVID, C.;MARRONI, N. A.;FERRAZ, A. C. Evaluation of chronic omega-3 fatty acids supplementation on behavioral and neurochemical alterations in 6-hydroxydopamine-lesion model of Parkinson's disease. **Neurosci Res**, v.66, n.3, Mar, p.256-64. 2011.

DETKE, M. J.;RICKELS, M.;LUCKI, I. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. **Psychopharmacology (Berl)**, v.121, n.1, Sep, p.66-72. 1995.

DEUSSING, J. M. Animal Models of Depression. **Drug Discovery Today: Disease Models**, v.3, n.4, p.375-383. 2006.

DOUMA, T. N.;BORRE, Y.;HENDRIKSEN, H.;OLIVIER, B.;OOSTING, R. S. Simvastatin improves learning and memory in control but not in olfactory bulbectomized rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v.216, n.4, Aug, p.537-44. 2011.

DOWLATI, Y.;HERRMANN, N.;SWARDFAGER, W.;LIU, H.;SHAM, L.;REIM, E. K.;LANCTOT, K. L. A meta-analysis of cytokines in major depression. **Biol Psychiatry**, v.67, n.5, Mar 1, p.446-57. 2010.

DUMAN, R. S.;HENINGER, G. R.;NESTLER, E. J. A molecular and cellular theory of depression. **Arch Gen Psychiatry**, v.54, n.7, Jul, p.597-606. 1997.

EDWARDS, R.;PEET, M.;SHAY, J.;HORROBIN, D. Omega-3 polyunsaturated fatty acid levels in the diet and in red blood cell membranes of depressed patients. **J Affect Disord**, v.48, n.2-3, Mar, p.149-55. 1998.

ELFVING, B.;PLOUGMANN, P. H.;WEGENER, G. Detection of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in rat blood and brain preparations using ELISA: pitfalls and solutions. **J Neurosci Methods**, v.187, n.1, Mar 15, p.73-7. 2010.

ENNACEUR, A.;MICHALIKOVA, S.;BRADFORD, A.;AHMED, S. Detailed analysis of the behavior of Lister and Wistar rats in anxiety, object recognition and object location tasks. **Behav Brain Res**, v.159, n.2, Apr 30, p.247-66. 2005.

FAROOQUI, A. A.;HORROCKS, L. A.;FAROOQUI, T. Glycerophospholipids in brain: their metabolism, incorporation into membranes, functions, and involvement in neurological disorders. **Chem Phys Lipids**, v.106, n.1, Jun, p.1-29. 2000.

FEDOROVA, I.;HUSSEIN, N.;DI MARTINO, C.;MORIGUCHI, T.;HOSHIBA, J.;MAJCHRZAK, S.;SALEM, N., JR. An n-3 fatty acid deficient diet affects mouse spatial learning in the Barnes circular maze. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v.77, n.5-6, Nov-Dec, p.269-77. 2007.

FEDOROVA, I.;SALEM, N., JR. Omega-3 fatty acids and rodent behavior. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v.75, n.4-5, Oct-Nov, p.271-89. 2006.

FERRAZ, A. C.;DELATTRE, A. M.;ALMENDRA, R. G.;SONAGLI, M.;BORGES, C.;ARAUJO, P.;ANDERSEN, M. L.;TUFIK, S.;LIMA, M. M. Chronic omega-3 fatty acids supplementation promotes beneficial effects on anxiety, cognitive and depressive-like behaviors in rats subjected to a restraint stress protocol. **Behav Brain Res**, v.219, n.1, May 16, p.116-22. 2011.

FERRAZ, A. C.;KISS, A.;ARAUJO, R. L.;SALLES, H. M.;NALIWAICO, K.;PAMPLONA, J.;MATHEUSSI, F. The antidepressant role of dietary long-chain polyunsaturated n-3 fatty acids in two phases in the developing brain. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v.78, n.3, Mar, p.183-8. 2008.

FREEMAN, M. P. Omega-3 fatty acids and perinatal depression: a review of the literature and recommendations for future research. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v.75, n.4-5, Oct-Nov, p.291-7. 2006.

FREEMAN, M. P. Complementary and alternative medicine for perinatal depression. **J Affect Disord**, v.112, n.1-3, Jan, p.1-10. 2009.

GARÓFOLO, A.; PETRILLI, A. S. Balanço entre ácidos graxos ômega-3 e 6 na resposta inflamatória em pacientes com câncer e caquexia. **Revista de Nutrição de Campinas**, v.19, n.5, p.611-621, 2006.

GOMEZ-PINILLA, F. Brain foods: the effects of nutrients on brain function. **Nature Reviews Neuroscience**, v.9, p.568-578. 2008.

GOYAL, S. N.;UPADHYA, M. A.;KOKARE, D. M.;BHISIKAR, S. M.;SUBHEDAR, N. K. Neuropeptide Y modulates the antidepressant activity of imipramine in olfactory bulbectomized rats: involvement of NPY Y1 receptors. **Brain Res**, v.1266, Apr 17, p.45-53. 2009.

HARKIN, A. K., J. P.; LEONARD, B. E. A review of the relevance and validity of olfactory bulbectomy as a model of depression
Clinical Neuroscience Research, v.3, n.4-5, p.253-264. 2003.

HENDRIKSEN, H.;MEULENDIJKS, D.;DOUMA, T. N.;BINK, D. I.;BREUER, M. E.;WESTPHAL, K. G.;OLIVIER, B.;OOSTING, R. S. Environmental enrichment has

antidepressant-like action without improving learning and memory deficits in olfactory bulbectomized rats. **Neuropharmacology**, v.62, n.1, Jan, p.270-7. 2012.

HENINGER, G. R.;DELGADO, P. L.;CHARNEY, D. S. The revised monoamine theory of depression: a modulatory role for monoamines, based on new findings from monoamine depletion experiments in humans. **Pharmacopsychiatry**, v.29, n.1, Jan, p.2-11. 1996.

INNIS, S. M. The role of dietary n-6 and n-3 fatty acids in the developing brain. **Dev Neurosci**, v.22, n.5-6, Sep-Dec, p.474-80. 2000.

INNIS, S. M. Fatty acids and early human development. **Early Hum Dev**, v.83, n.12, Dec, p.761-6. 2007.

INNIS, S. M.;ELIAS, S. L. Intakes of essential n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids among pregnant Canadian women. **Am J Clin Nutr**, v.77, n.2, Feb, p.473-8. 2003.

JANCSAR, S. M.;LEONARD, B. Changes in neurotransmitter metabolism following olfactory bulbectomy in the rat. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v.8, p.263-269. 1984.

JOSEPH, J. D.; ACKMAN, R. G. Capillary column gas-chromatographic method for analysis of encapsulated fish oils and fish oil ethyl-esters - Collaborative study. **Journal of AOAC International**, v.75, n.3, p.488-506, 1992.

KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSELL, T. M. **Principles of Neural Science**. 4ed. São Paulo: McGraw-Hill, 2000.

KAREGE, F.;BONDOLFI, G.;GERVASONI, N.;SCHWALD, M.;AUBRY, J. M.;BERTSCHY, G. Low brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in serum of depressed patients probably results from lowered platelet BDNF release unrelated to platelet reactivity. **Biol Psychiatry**, v.57, n.9, May 1, p.1068-72. 2005a.

KAREGE, F.;PERRET, G.;BONDOLFI, G.;SCHWALD, M.;BERTSCHY, G.;AUBRY, J. M. Decreased serum brain-derived neurotrophic factor levels in major depressed patients. **Psychiatry Research**, v.109, p.143–148. 2002.

KAREGE, F.;VAUDAN, G.;SCHWALD, M.;PERROUD, N.;LA HARPE, R. Neurotrophin levels in postmortem brains of suicide victims and the effects of antemortem diagnosis and psychotropic drugs. **Brain Res Mol Brain Res**, v.136, n.1-2, May 20, p.29-37. 2005b.

KELLY, J. P.;WRYNN, A. S.;LEONARD, B. The olfactory bulbectomized rat as a model of depression: An update. **Pharmacology & Therapeutics**, v.74, n.3, p.299-316. 1997.

KHAN, M.;SINGH, J.;GILG, A. G.;UTO, T.;SINGH, I. Very long-chain fatty acid accumulation causes lipotoxic response via 5-lipoxygenase in cerebral adrenoleukodystrophy. **J Lipid Res**, v.51, n.7, Jul, p.1685-95. 2010.

KISS, J. P. Theory of active antidepressants: A nonsynaptic approach to the treatment of depression. **Neurochemistry International**, v.52, p.34-39, 2008.

KOLETZKO, B.; CETIN, I.; BRENNAN, T. Dietary fat intakes for pregnant and lactating women. **British Journal of Nutrition**, april, p.1-5, 2007.

KUBERA, M.; OBUCHOWICZ, E.; GOEHLER, L.; BRZESZCZ, J.; MAES, M. In animal models, psychosocial stress-induced (neuro)inflammation, apoptosis and reduced neurogenesis are associated to the onset of depression. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v.35, n.3, Apr 29, p.744-59. 2010.

KURITA, M.; NISHINO, S.; KATO, M.; NUMATA, Y.; SATO, T. Plasma brain-derived neurotrophic factor levels predict the clinical outcome of depression treatment in a naturalistic study. **PLoS One**, v.7, n.6, p.e39212. 2012.

LAPILLONNE, A.; CLARKE, S. D.; HEIRD, W. C. Plausible mechanisms for effects of long-chain polyunsaturated fatty acids on growth. **J Pediatr**, v.143, n.4 Suppl, Oct, p.S9-16. 2003.

LAURITZEN, L.; HANSEN, H. S.; JORGENSEN, M. H.; MICHAELSEN, K. F. The essentiality of long chain n-3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina. **Prog Lipid Res**, v.40, n.1-2, Jan-Mar, p.1-94. 2001.

LAYE, S. Polyunsaturated fatty acids, neuroinflammation and well being. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v.82, n.4-6, Apr-Jun, p.295-303. 2010.

LIN, P. Y.; HUANG, S. Y.; SU, K. P. A meta-analytic review of polyunsaturated fatty acid compositions in patients with depression. **Biol Psychiatry**, v.68, n.2, Jul 15, p.140-7. 2010.

LITTLE, S. J.; LYNCH, M. A.; MANKU, M.; NICOLAOU, A. Docosahexaenoic acid-induced changes in phospholipids in cortex of young and aged rats: a lipidomic analysis. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v.77, n.3-4, Oct-Nov, p.155-62. 2007.

LOFTIS, J. M.; HUCKANS, M.; MORASCO, B. J. Neuroimmune mechanisms of cytokine-induced depression: current theories and novel treatment strategies. **Neurobiol Dis**, v.37, n.3, Mar, p.519-33. 2010.

LUO, K. R.; HONG, C. J.; LIOU, Y. J.; HOU, S. J.; HUANG, Y. H.; TSAI, S. J. Differential regulation of neurotrophin S100B and BDNF in two rat models of depression. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v.34, n.8, Dec 1, p.1433-9. 2010.

MACHADO, R. B., TUFIK, S., SUCHECKI, D. Chronic stress during paradoxical sleep deprivation increases paradoxical sleep rebound: association with prolactin plasma levels and brain serotonin content. **Psychoneuroendocrinology** v.33, p.1211-1224, 2008.

Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais. Texto Revisado (DSM-IV-TR). American Psychiatric Association. 4ed. Porto Alegre: Artmed, 2000.

MAR, A.;SPREEKMEESTER, E.;ROCKFORD, J. Fluoxetine-induced increases in open-field habituation in the olfactory bulbectomized rat depend on test aversiveness but not on anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.73, n.3, p.703-712. 2002.

MARTIN, C. A.; ALMEIDA, V. V.; RUIZ, M.R.; VISENTAINER, J. E. L.; MATSHUSHITA, M.; SOUZA, N. E.; VISENTAINER, J. V. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. **Revista de Nutrição de Campinas**, v.19, n.6, p.761-770, 2000.

MARTINOWICH, K.;LU, B. Interaction between BDNF and serotonin: role in mood disorders. **Neuropsychopharmacology**, v.33, p.73-83. 2008.

MCNAMARA, R. K. The emerging role of omega-3 fatty acids in psychiatry. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v.75, n.4-5, Oct-Nov, p.223-5. 2006.

MCNAMARA, R. K.;JANDACEK, R.;RIDER, T.;TSO, P.;COLE-STRAUSS, A.;LIPTON, J. W. Omega-3 fatty acid deficiency increases constitutive pro-inflammatory cytokine production in rats: relationship with central serotonin turnover. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v.83, n.4-6, Oct-Dec, p.185-91. 2010.

MORALES-MEDINA, J. C.;DUMONT, Y.;BENOIT, C.;BASTIANETTO, S.;FLORES, G.;FOURNIER, A.;QUIRION, R. Role of neuropeptide Y Y1 e Y2 receptors on behavioral despair in a rat model of depression with co-morbid anxiety. **Neuropharmacology**, v.62, p.200-208. 2012.

MORIGUCHI, S.;HAN, F.;NAKAGAWASAI, O.;TADANO, T.;FUKUNAGA, K. Decreased calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C activities mediate impairment of hippocampal long-term potentiation in the olfactory bulbectomized mice. **J Neurochem**, v.97, n.1, Apr, p.22-9. 2006.

MUCIGNAT-CARETTA, C.;BONDI, M.;CARETTA, A. Time course of alterations after olfactory bulbectomy in mice. **Physiol Behav**, v.89, n.5, Dec 30, p.637-43. 2006.

NALIWAIKO, K.;ARAUJO, R. L.;DA FONSECA, R. V.;CASTILHO, J. C.;ANDREATINI, R.;BELLISSIMO, M. I.;OLIVEIRA, B. H.;MARTINS, E. F.;CURI, R.;FERNANDES, L. C.;FERRAZ, A. C. Effects of fish oil on the central nervous system: a new potential antidepressant? **Nutritional Neuroscience**, v.7, p.91-99. 2004.

NESTLER, E. J.;BARROT, M.;DILEONE, R. J.;EISCH, A. J.;GOLD, S. J.;MONTEGGIA, L. M. Neurobiology of depression. **Neuron**, v.34, n.1, Mar 28, p.13-25. 2002.

ORAL, E.;CANPOLAT, S.;YILDIRIM, S.;GULEC, M.;ALIYEV, E.;AYDIN, N. Cognitive functions and serum levels of brain-derived neurotrophic factor in patients with major depressive disorder. **Brain Res Bull**, v.88, n.5, Aug 1, p.454-9. 2012.

OSTROVSKAYA, R. U.;GRUDEN, M. A.;BOBKOVA, N. A.;SEWELL, R. D. E.;GUDASHEVA, T. A.;SAMOKHIN, A. N.;SEREDININ, S. B.;NOPPE, W.;SHERSTNEV, V. V.;MOROZOVA-ROCHE, L. A. The nootropic and neuroprotective proline-containing dipeptide noopept restores spatial memory and increases immunoreactivity to amyloid in an Alzheimer's disease model. **J Psychopharmacol** v.21, n.6, p.611-619. 2007.

PANG, P. T.;LU, B. Regulation of late-phase LTP and long-term memory in normal and aging hippocampus: role of secreted proteins tPA and BDNF. **Ageing Res Rev**, v.3, n.4, Nov, p.407-30. 2004.

PANG, P. T.;TENG, H. K.;ZAITSEV, E.;WOO, N. T.;SAKATA, K.;ZHEN, S.;TENG, K. K.;YUNG, W. H.;HEMPSTEAD, B. L.;LU, B. Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. **Science**, v.306, n.5695, Oct 15, p.487-91. 2004.

PEET, M.;MURPHY, B.;SHAY, J.;HORROBIN, D. Depletion of omega-3 fatty acid levels in red blood cell membranes of depressive patients. **Biol Psychiatry**, v.43, n.5, Mar 1, p.315-9. 1998.

PELLOW, S.;CHOPIN, P.;FILE, S. E.;BRILEY, M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J Neurosci Methods**, v.14, n.3, Aug, p.149-67. 1985.

PICCINNI, A.;MARAZZITI, D.;CATENA, M.;DOMENICI, L.;DEL DEBBIO, A.;BIANCHI, C.;MANNARI, C.;MARTINI, C.;DA POZZO, E.;SCHIAVI, E.;MARIOTTI, A.;RONCAGLIA, I.;PALLA, A.;CONSOLI, G.;GIOVANNINI, L.;MASSIMETTI, G.;DELL'OSSO, L. Plasma and serum brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients during 1 year of antidepressant treatments. **Journal of Affective Disorders**, v.105, n.1, p.279-283. 2008.

POPE, K.;WILSON, D. A. Olfactory system modulation of hippocampal cell death. **Neurosci Lett**, v.422, n.1, Jul 5, p.13-7. 2007.

PORSOLT, R. D.;LE PICHON, M.;JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, v.266, n.5604, Apr 21, p.730-2. 1977.

PRIMEAUX, S. D.;BARNES, M. J.;BRAY, G. A. Olfactory bulbectomy increases food intake and hypothalamic neuropeptide Y in obesity-prone but not obesity-resistant rats. **Behav Brain Res**, v.180, n.2, Jun 18, p.190-6. 2007.

REDMONT, A. M.;KELLY, J. P.;LEONARD, B. Behavioral and neurochemical effects of dizocilpine in the olfactory bulbectomized rat model of depression. **Pharmacol Biochem Behav**, v.62, p.619-623. 1997.

REYNOLDS, C. M.;ROCHE, H. M. Conjugated linoleic acid and inflammatory cell signalling. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v.82, n.4-6, Apr-Jun, p.199-204. 2010.

RIEMER, S.;MAES, M.;CHRISTOPHE, A.;RIEF, W. Lowered omega-3 PUFAs are related to major depression, but not to somatization syndrome. **J Affect Disord**, v.123, n.1-3, Jun, p.173-80. 2010.

RODRÍGUEZ-CRUZ, M.;TOVAR, A. R.;DEL PRADO, M.;TORRES, N. Mecanismos moleculares de acción de los ácidos grasos poliinsaturados y sus beneficios en la salud. **Revista de investigación clínica**, v.57, p.457-472. 2005.

ROSS, B. M. Omega-3 fatty acid deficiency in major depressive disorder is caused by the interaction between diet and a genetically determined abnormality in phospholipid metabolism. **Med Hypotheses**, v.68, n.3, p.515-24. 2007.

SAITO, S.;WATANABE, K.;HASHIMOTO, E.;SAITO, T. Low serum BDNF and food intake regulation: a possible new explanation of the pathophysiology of eating disorders. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v.33, n.2, Mar 17, p.312-6. 2009.

SATO, A.;NAKAGAWASAI, O.;TAN-NO, K.;ONOGI, H.;NIIJIMA, F.;TADANO, T. Influence of olfactory bulbectomy on maternal behavior and dopaminergic function in nucleus accumbens in mice. **Behav Brain Res**, v.215, n.1, Dec 20, p.141-5. 2010a.

SATO, H.;SKELIN, I.;DEBONNEL, G.;DIKSIC, M. Chronic buspirone treatment normalizes open field behavior in olfactory bulbectomized rats: assessment with a quantitative autoradiographic evaluation of the 5-HT_{1A} binding sites. **Brain Res Bull**, v.75, n.5, Mar 28, p.545-55. 2008.

SATO, H.;SKELIN, I.;DIKSIC, M. Chronic buspirone treatment decreases 5-HT_{1B} receptor densities and the serotonin transporter but increases the density of 5-HT_{2A} receptors in the bulbectomized rat model of depression: an autoradiographic study. **Brain Res**, v.1345, Jul 23, p.28-44. 2010b.

SHIODA, N.;YAMAMOTO, Y.;HAN, F.;MORIGUCHI, S.;YAMAGUCHI, Y.;HINO, M.;FUKUNAGA, K. A novel cognitive enhancer, ZSET1446/ST101, promotes hippocampal neurogenesis and ameliorates depressive behavior in olfactory bulbectomized mice. **J Pharmacol Exp Ther**, v.333, n.1, Apr, p.43-50. 2012.

SIMOPOULOS, A. P. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. **Biomed Pharmacother**, v.56, n.8, Oct, p.365-79. 2002.

SKELIN, I.;SATO, H.;DIKSIC, M. Olfactory bulbectomy reduces cerebral glucose utilization: 2-[¹⁴C]deoxyglucose autoradiographic study. **Brain Res Bull**, v.76, n.5, Jul 30, p.485-92. 2008.

SLOTKIN, T. A.;SEIDLER, F. J. Cholinergic receptor subtypes in the olfactory bulbectomy model of depression. **Brain Res Bull**, v.68, n.5, Jan 30, p.341-5. 2006.

SOHRABJI, F.;PEEPLER, K. W.;MARROQUIN, O. A. Local and cortical effects of olfactory bulb lesions on trophic support and cholinergic function and their modulation by estrogen. **J Neurobiol**, v.45, n.2, Nov 5, p.61-74. 2000.

SONG, C.;LEONARD, B. E. The olfactory bulbectomised rat as a model of depression. **Neurosci Biobehav Rev**, v.29, n.4-5, p.627-47. 2005.

SONG, C.;LI, X.;LEONARD, B. E.;HORROBIN, D. F. Effects of dietary n-3 or n-6 fatty acids on interleukin-1 β -induced anxiety, stress, and inflammatory responses in rats. **J Lipid Res**, v.44, n.10, Oct, p.1984-91. 2003.

SONG, C.;WANG, H. Cytokines mediated inflammation and decreased neurogenesis in animal models of depression. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v.35, n.3, Apr 29, p.760-8. 2010.

SONG, C.;ZHANG, X. Y.;MANKU, M. Increased Phospholipase A2 activity and inflammatory response but decreased nerve growth factor expression in the olfactory bulbectomized rat model of depression: effect of Chronic Ethyl-Eicosapentaenoate Treatment. **Neurobiology of Disease**, v.7, n.1, p.14022. 2009.

SU, B.;WANG, X.;NUNOMURA, A.;MOREIRA, P. I.;LEE, H. G.;PERRY, G.;SMITH, M. A.;ZHU, X. Oxidative stress signaling in Alzheimer's disease. **Curr Alzheimer Res**, v.5, n.6, Dec, p.525-32. 2008.

SU, H.-M. Mechanisms of n-3 fatty acids-mediated development and maintenance of learning memory performance. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.21, p.364-373. 2010.

SU, K. P.;HUANG, S. Y.;CHIU, C. C.;SHEN, W. W. Omega-3 fatty acids in major depressive disorder. A preliminary double-blind, placebo-controlled trial. **Eur Neuropsychopharmacol**, v.13, n.4, Aug, p.267-71. 2003.

THOMPSON, A.;BOEKHOORN, K.;VAN DAM, A.-M.;LUCASSEN, P. J. Changes in adult neurogenesis in neurodegenerative diseases: cause or consequence? **Genes, Brain and Behavior**, v.7, n.1, p.28-42. 2008.

TYLER, W. J.;ALONSO, M.;BRAMHAM, C. R.;POZZO-MILLER, L. D. From acquisition to consolidation: on the role of brain-derived neurotrophic factor signaling in hippocampal-dependent learning. **Learn Mem**, v.9, n.5, Sep-Oct, p.224-37. 2002.

VAIDYA, V. A.;DUMAN, R. S. Depression--emerging insights from neurobiology. **Br Med Bull**, v.57, p.61-79. 2001.

VAN DER STELT, H. M.;BREUER, M. E.;OLIVIER, B.;WESTENBERG, H. G. Permanent deficits in serotonergic functioning of olfactory bulbectomized rats: an in vivo microdialysis study. **Biol Psychiatry**, v.57, n.9, May 1, p.1061-7. 2005.

VAN HOOMISSEN, J.;KUNRATH, J.;DENTLINGER, R.;LAFRENZ, A.;KRAUSE, M.;AZAR, A. Cognitive and locomotor/exploratory behavior after chronic exercise in the olfactory bulbectomy animal model of depression. **Behav Brain Res**, v.222, n.1, Sep 12, p.106-16. 2011.

VAN HOOMISSEN, J. D.;CHAMBLISS, H. O.;HOLMES, P. V.;DISHMAN, R. K. Effects of chronic exercise and imipramine on mRNA for BDNF after olfactory bulbectomy in rat. **Brain Res**, v.974, n.1-2, Jun 6, p.228-35. 2003.

VENNA, V. R.;DEPLANQUE, D.;ALLET, C.;BELARBI, K.;HAMDANE, M.;BORDET, R. PUFA induce antidepressant-like effects in parallel to structural and molecular changes in the hippocampus. **Psychoneuroendocrinology**, v.34, n.2, Feb, p.199-211. 2009.

VINES, A.;DELATTRE, A. M.;LIMA, M. M.;RODRIGUES, L. S.;SUCHECKI, D.;MACHADO, R. B.;TUFIK, S.;PEREIRA, S. I.;ZANATA, S. M.;FERRAZ, A. C. The role of 5-HT(1)A receptors in fish oil-mediated increased BDNF expression in the rat hippocampus and cortex: a possible antidepressant mechanism. **Neuropharmacology**, v.62, n.1, Jan, p.184-91. 2012.

VINKERS, C. H.;BREUER, M. E.;WESTPHAL, K. G.;KORTE, S. M.;OOSTING, R. S.;OLIVIER, B.;GROENINK, L. Olfactory bulbectomy induces rapid and stable changes in basal and stress-induced locomotor activity, heart rate and body temperature responses in the home cage. **Neuroscience**, v.159, n.1, Mar 3, p.39-46. 2009.

VINOD, K. Y.;XIE, S.;PSYCHOYOS, D.;HUNGUND, B. L.;COOPER, T. B.;TEJANI-BUTT, S. M. Dysfunction in fatty acid amide hydrolase is associated with depressive-like behavior in Wistar Kyoto rats. **PLoS One**, v.7, n.5, p.e36743. 2012.

WANG, D.;NODA, Y.;TSUNEKAWA, H.;ZHOU, Y.;MIYAZAKI, M.;SENZAKI, K.;NABESHIMA, T. Behavioral and neurochemical features of olfactory bulbectomized rats resembling depression with comorbid anxiety. **Behavioral Brain Research**, v.178, n.1, p.262-273. 2007.

WANG, J. W.;DRANOVSKY, A.;HEN, R. The when and where of BDNF and the antidepressant response. **Biol Psychiatry**, v.63, n.7, Apr 1, p.640-1. 2008.

WANG, W.;QI, W. J.;XU, Y.;WANG, J. Y.;LUO, F. The differential effects of depression on evoked and spontaneous pain behaviors in olfactory bulbectomized rats. **Neurosci Lett**, v.472, n.2, Mar 19, p.143-7. 2010.

WANN, B. P.;D'ANJOU, B.;BAH, T. M.;WEBSTER, H. H.;GODBOUT, R.;ROUSSEAU, G. Effect of olfactory bulbectomy on adenylyl cyclase activity in the limbic system. **Brain Res Bull**, v.79, n.1, Apr 6, p.32-6. 2009.

WATANABE, A.;TOHYAMA, Y.;NGUYEN, K. Q.;HASEGAWA, S.;DEBONNEL, G.;DIKSIC, M. Regional brain serotonin synthesis is increased in the olfactory bulbectomy rat model of depression: an autoradiographic study. **J Neurochem**, v.85, n.2, Apr, p.469-75. 2003.

WIERONSKA, J. M.;PAPP, P. A. Effects of anxiolytic drugs on some behavioral consequences in olfactory bulbectomized rats. **Pol J Pharmacol**, v.53, p.517-525. 2001.

WILLIAMS, M. A.;FREDERICK, I. O.;QIU, C.;MERYMAN, L. J.;KING, I. B.;WALSH, S. W.;SORENSEN, T. K. Maternal erythrocyte omega-3 and omega-6 fatty acids, and plasma lipid concentrations, are associated with habitual dietary fish consumption in early pregnancy. **Clin Biochem**, v.39, n.11, Nov, p.1063-70. 2006.

WILLNER, P. The validity of animal models of depression. **Psychopharmacology (Berl)**, v.83, n.1, p.1-16. 1984.

VOET, D.; VOET, J. G.**Bioquímica**. 3ed. Porto Alegre: Artmed, p.383-455, 2006.

WU, A.;YINGA, Z.;GOMEZ-PINILLA, F. Docosahexaenoic acid dietary supplementation enhances the effects of exercise on synaptic plasticity and cognition. **Neuroscience**, v.155, n.3, p.751–759. 2008.

YAMADA, M.;HAYASHIDA, M.;ZHAO, Q.;SHIBAHARA, N.;TANAKA, K.;MIYATA, T.;MATSUMOTO, K. Ameliorative effects of yokukansan on learning and memory deficits in olfactory bulbectomized mice. **J Ethnopharmacol**, v.135, n.3, Jun 1, p.737-46. 2011.

YOUDIM, M. B.;YEHUDA, S. The neurochemical basis of cognitive deficits induced by brain iron deficiency: involvement of dopamine-opiate system. **Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)**, v.46, n.3, May, p.491-500. 2000.

YU, H.;CHEN, Z. The role of BDNF in depression on the basis of its location in the neural circuitry. **Acta Pharmacologica Sinica**, v.32, p.3-11. 2011.

ZHANG, H. T.;HUANG, Y.;JIN, S. L.;FRITH, S. A.;SUVARNA, N.;CONTI, M.;O'DONNELL, J. M. Antidepressant-like profile and reduced sensitivity to rolipram in mice deficient in the PDE4D phosphodiesterase enzyme. **Neuropsychopharmacology**, v.27, n.4, Oct, p.587-95. 2002.

ZUEGER, M.;URANI, A.;CHOURBAJI, S.;ZACHER, C.;ROCHE, M.;HARKIN, A.;GASS, P. Olfactory bulbectomy in mice induces alterations in exploratory behavior. **Neurosci Lett**, v.374, n.2, Feb 10, p.142-6. 2005.